

Die Geruchstoffe der Stinkmorchel
Phallus impudicus L.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Bernhard Freund

aus Wuppertal

Marburg 1967

Die Geruchstoffe der Stinkmorchel
Phallus impudicus L.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Bernhard Freund

aus Wuppertal

Marburg 1967

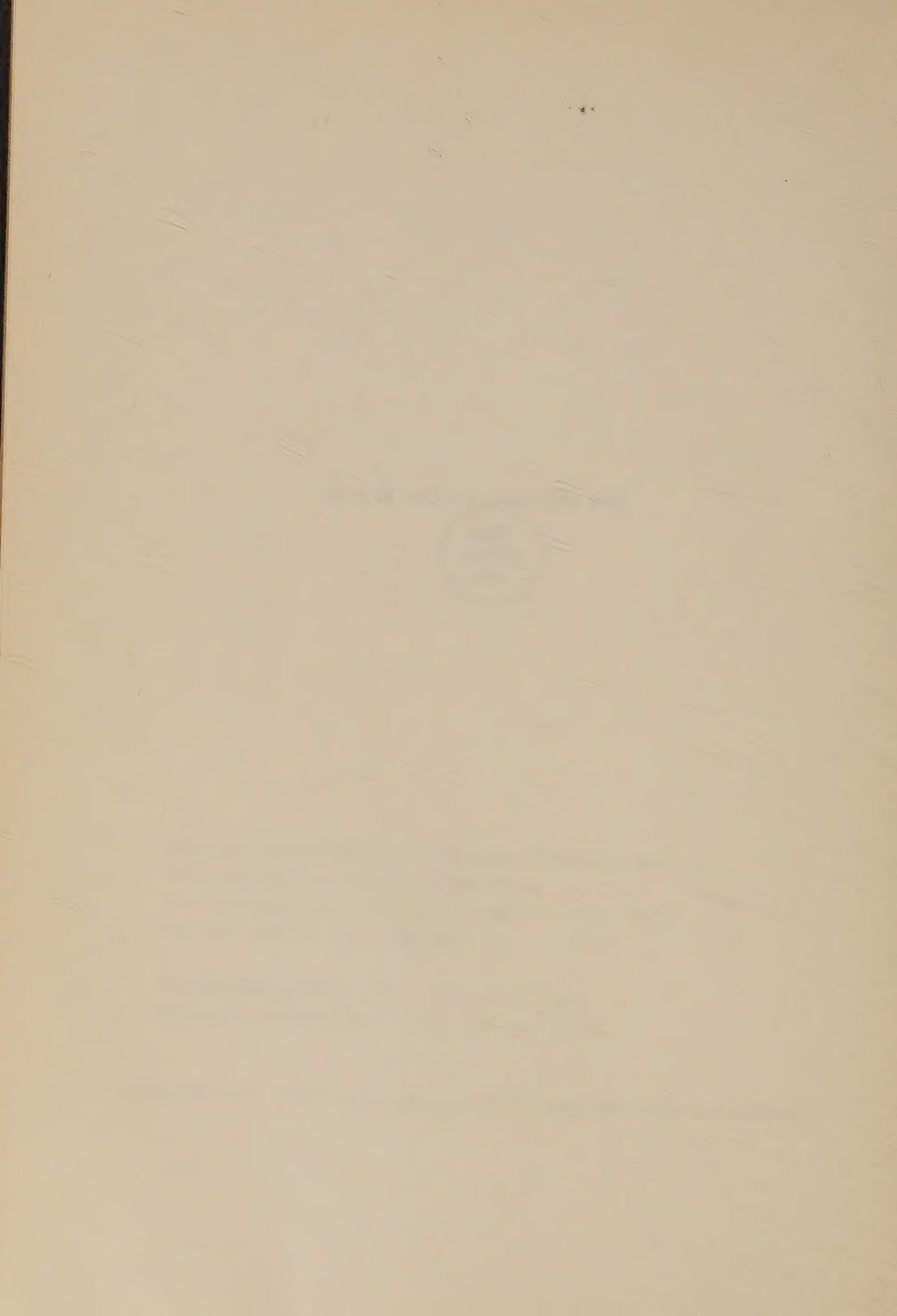


Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Philipps-Universität Marburg/Lahn
als Dissertation angenommen am: 21. 12. 1967
Tag der mündlichen Prüfung: 31. 1. 1968

Berichterstatter: Prof. Dr. P.H. List
Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Böhme

Gedruckt mit Unterstützung des Marburger Universitätsbundes

Dem Andenken meiner Eltern



INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung und Problemstellung	7
ALLGEMEINER TEIL	
Die Stinkmorchel im historischen Schrifttum	11
Bisher bekannte organische Inhaltsstoffe der Stinkmorchel	13
Isolierung und Identifizierung der Geruch= stoffe	15
Gewinnung eines Geruchstoffkondensates und Fällung der 2,4-Dinitrophenyl= hydrazone	17
Formaldehyd	22
Acetaldehyd	22
Phenylacetaldehyd	22
α -Phenylcrotonaldehyd	24
Gewinnung des Wasserdampfdestillates	28
Dihydrochalcon	30
Phenyllessigsäure	35
Essigsäure	36
Propionsäure	36
Kondensierung leicht flüchtiger Schwefelverbindungen und Fällung der 2,4-Dinitrophenyl-sulfide	37
Methylmercaptan	39
Schwefelwasserstoff	39
Isolierung und Identifizierung anderer Inhaltsstoffe	41
Glucose	41
5-Dihydroergosterinester	42
Diskussion	44
Zusammenfassung	46

EXPERIMENTELLER TEIL

Allgemeine Hinweise	47
Zur Chromatographie an Kieselgel	49
Vorversuche	51
Vorversuch zur Tieftemperatur-Vakuum=destillation	51
Nachweis von Carbonylverbindungen in der Gasphase über dem Pilz	51
Tieftemperatur-Vakuumdestillation des Pilz=materials	52
Fällung und Isolierung der 2,4-Dinitro=phenylhydrazone, Darstellung der Ver=gleichssubstanzen	52
Daten und Spektren zu:	
Formaldehyd (Subst.4)	54
Acetaldehyd (Subst.3)	55
Phenylacetaldehyd (Subst.2)	56
α -Phenylcrotonaldehyd (Subst.1)	56
Wasserdampfdestillation des Pilzmaterials	64
Isolierung von Dihydrochalcon (Subst. W ₂)	65
Daten und Spektren zu Dihydrochalcon	64
Bearbeitung der Carbonsäurefraktion (Zone 7)	68
Veresterung und Darstellung der Hydroxam=säuren	68
Chromatographie an Cellulose	68
Isolierung des Phenylelessigsäurehydrox=amates	69
Daten und Spektren zu Phenylelessigsäure	70
Gaschromatographie der Carbonsäure=fraktion (Zone 7)	72
Gewinnung der flüchtigen Schwefelverbindungen	75
Umsetzung mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol und Isolierung der Derivate	75
Blindversuch mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol	76
Daten und Spektren zu:	
Methylmercaptan (Subst. 8-D)	77
Schwefelwasserstoff (Subst. 9-D)	79
Isolierung und Identifizierung der Glucose	82
Isolierung und Spaltung des 5-Dihydroergosterin=esters	83
Daten und Spektren zu dem Ester und seinen Spaltprodukten	84
LITERATURVERZEICHNIS	87



Abb. 1 Von Aasfliegen besuchte Stinkmorchel am Standort.

EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Stinkmorchel, *Phallus impudicus* L., ist nach ENGEL (1) ein Pilz aus der Klasse der Ständerpilze (Basidiomycetes), Unterklasse Innensporer (Gasteromycetidae). Sie gehört zur Ordnung der Rutenpilzartigen (Phallales), Familie: Rutenpilze (Phallaceae).

Dieser auffällige Pilz kommt in der Zeit von Juni bis Oktober gesellig in Laub- und Nadelwäldern vor. Der unterirdisch angelegte Fruchtkörper bricht zunächst in kugel-

bis eiförmiger Gestalt als sog. Hexenei aus dem Boden, das erdwärts mit einem derben Mycelstrang versehen ist. Ein Querschnitt durch diese etwa 3 bis 8 cm groß werdende Vorstufe zeigt den fertig angelegten, noch gestauchten Pilz mit den umgebenden Geweben, der Volva. (Abb. 2).



Abb. 2 Hexenei der Stinkmorchel im Querschnitt.

Unter der weißen bis weißbraunen, derben Außenhaut, der Peridie, liegt eine mehrere mm dicke bräunlich durchscheinende Gallertschicht, nach innen von der dritten Volvaschicht begrenzt. Diese Schichten umgeben schützend die Anlage des späteren Pilzhutes und -stieles, das Receptaculum. Zur Reifezeit streckt sich der Stiel in wenigen Stunden beträchtlich bis zu einer Länge von 10 bis 20 cm, wobei der Hut die Volva durchbricht.

Nach vollendeter Streckung des Stieles beginnt die Gleba unter Verfärbung zu einem schwarzgrünen Sporenschleim zu zerfließen und einen aasartigen, bei Windstille für den Menschen in oft noch mehr als 10 m Entfernung vom Standort wahrnehmbaren Geruch zu verströmen.

Durch den Geruch werden Aasinsekten angelockt, die sich auf dem Sporenschleim niederlassen und ihn fressen (Abb. 3).

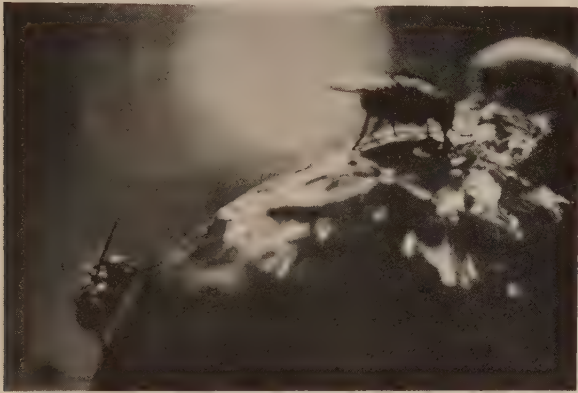


Abb. 3 Aasfliegen auf der reifen Gleba.

SCHREMMER (2) beobachtete auf einem Exemplar von *Phallus impudicus* Schmeißfliegen (*Calliphora erythrocephala*), Goldfliegen (*Lucilia caesar* und *Lucilia ampullacea*) und Fliegen der Art *Dryomyza analis*, die von dem Schleim fraßen. Nach SCHREMMER dienen die Fliegen der endozoischen Sporenverbreitung. Der Autor vermutet, daß durch den beim Fressen abgegebenen Speichel und die Darmpassage die Sporen von der Kittsubstanz befreit werden. Hierauf erfolgt die Ausscheidung mit dem Kot. Die Sporen sind dann im wässerigen Medium leicht beweglich und damit der Verbreitung zugänglich.

Die Sporenverbreitung durch Insekten, wie sie in der Ordnung der Phallales üblich ist, ist für Pilze nach JAHN (3) ungewöhnlich.

Der Geruch, den die Stinkmorchel im reifen Zustand verströmt, wird in der Pilzliteratur sehr mannigfaltig charak-

terisiert. Man findet Bezeichnungen wie "stark, süßlich und ekelhaft" (4), "übel und kadaverös" (5), "widerlich und außerordentlich stark nach Leichen riechend" (6), "durchdringender Aasgeruch" (3), "durchdringender Gestank" (1).

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Geruch der Stinkmorchel chemisch näher zu charakterisieren.

ALLGEMEINER TEIL

Die Stinkmorchel im historischen Schrifttum

Die Bezeichnung "Phallus", die für dieses Genus der Familie der Phallaceae schon lange vor der Benennung der Stinkmorchel durch Linné gebraucht wurde (z.B. bei JONGHE (9)), beleuchtet die gedanklichen und magischen Vorstellungen, die diesen Pilz umgaben. Es ist nicht verwunderlich, daß solche Vorstellungen auf Ablehnung stießen: So schrieb SCHÄFFER (4) 1760 in seiner unten erwähnten Monographie in diesem Zusammenhang: "Die Vergleichung, welche die meisten Schwammschreiber mit einem gewissen Teile des menschlichen Körpers machen, übergehe ich mit Stillschweigen." Die medizinische Anwendung der Stinkmorchel als Aphrodisiacum scheint jedoch allein aus der Signaturenlehre erklärlich zu sein. Noch im 18. Jahrhundert glaubte man, daß dieser Pilz aus dem Samen der Hirsche gebildet werde, wie z.B. in der 1731 in Basel erschienenen, von C.Bauhin bearbeiteten Ausgabe des Kräuterbuches von Jacobus Theodorus TABERNAEMONTANUS (7) berichtet ist.

Doch schon in der 1679 in Ulm erschienenen späteren Ausgabe des Kräuterbuches von Adamus LONICERUS+(8) wurden die Vorstellungen von der vermeintlichen Entstehung und Indikation des Pilzes als falsch bezeichnet. Die Meinung, daß die Stinkmorchel ein Aphrodisiacum sei, scheint sich dennoch lange gehalten zu haben. KROMBHOLZ (5), der in den Jahren 1831 bis 1846 ein vielbändiges Pilzwerk schrieb, stellte eigens Versuche an Menschen und Tieren an, um diese Frage zu klären. Er konnte keinerlei pharmakologische Wirkung beobachten. Nicht nur die Tiere, selbst die Versuchspersonen verhielten sich, wie KROMBHOLZ berichtet, "... ganz untätig in der gewissen Beziehung". KROMBHOLZ wertete diesen Versuch auch als Beweis für die Ungiftigkeit des Pilzes, der bis dahin nach seinen Angaben noch vielfach zu den Giftpilzen gezählt worden war.

Weitere Indikationen von Zubereitungen der Stinkmorchel

waren Rheuma und Gicht, wie die Synonyma "Gichtmorchel" und "Gichtschwamm" zeigen (5).

Wieviel Beachtung man der späteren Familie der Phallaceae schenkte, zeigt die Tatsache, daß schon 1601 eine eigene Arbeit von dem Holländer JONGHE (9) mit dem Titel "Phallus ex fungorum genere in Hollandiae sabuletis passim crescentis descriptio, ..." erschien.*) Eine weitere Monographie mit dem Titel "Beschreibung des Gichtschwammes mit grünschleimigem Hute" verfaßte SCHÄFFER (4) 1760.

Befaßt sich die letzte Arbeit, der Zeit entsprechend, noch weitgehend mit der Beschreibung morphologischer und anatomischer Gegebenheiten des Pilzes, so bringt der Beginn des 19. Jahrhunderts die Hinwendung zur chemischen Analyse.

*) Aus dem angegebenen Standort "in sabuletis" (sabuletum, i.N. ein sandiger Ort) ist zu vermuten, daß es sich bei dem von JONGHE beschriebenen Pilz um die der Stinkmorchel im Habitus sehr ähnliche Dünenstinkmorchel handelt, die heute die botanische Bezeichnung "Phallus hadrianus" trägt. (JONGHE hieß mit Vornamen Adrianus)

Bisher bekannte organische Inhaltsstoffe der Stinkmorchel

Im Jahre 1811 berichtete BRACONNOT (10) über das Vorkommen der Essigsäure in Form ihrer Salze in diesem Pilz. Einige der von ihm erwähnten Substanzen, wie z.B. "Mucus", "Matière animale" und "Fongin très-animalisé" sind chemisch noch wenig faßbar, genauer die Angaben "Adipocire" (walratartiges Fett) und "Matière huileuse" (fettes Öl).

An Kohlenhydraten fand BRACONNOT (10) "Sucre de champignons", Schwammzucker, der nach ZELLNER (11) mit Mannit identisch ist.

Über den Nachweis von Glucose, Fructose und die vermutliche Anwesenheit von Trehalose berichteten 1883 RATHAY und HAAS (12). BOURQUELOT (13) jedoch zweifelte sechs Jahre später das Vorkommen der Fructose an, die nicht isoliert, sondern nur indirekt nachgewiesen worden war. Über den Nachweis von Glykogen berichtet ebenfalls ZELLNER (11).

An stickstoffhaltigen Substanzen wurden zunächst 1928 von KLEIN und STEINER (14) flüchtige Amine angezeigt: Dimethylamin, Trimethylamin und i-Amylamin. Mit Hilfe einer genaueren papierchromatographischen Methode wiesen STEINER und STEIN v. KAMIENSKI (15) 1953 nur Trimethylamin und i-Amylamin nach.

Ausgehend von der Beobachtung, daß Fliegen nach Fressen des Stinkmorchel-Sporenschleimes sterben, isolierte STEFANESCU (16) ein im Tierversuch tonisch-klonische Krämpfe verursachendes Alkaloid mit der Summenformel $C_{29}H_{34}O_9N_7S$, über dessen Struktur er keine Angaben machte.

- *) Die Stinkmorchel ist zwar ungenießbar, jedoch nicht giftig. Schon KROMBOLZ (5) bewies, wie bereits erwähnt, die Ungiftigkeit des Pilzes, der in der Vorzeit allgemein als giftig angesehen worden war. Hexeneier gelten noch heute in bestimmten Gegenden als Delikatesse. Bei der Beobachtung von vielen Exemplaren des Pilzes konnte ich selbst keinen Anhaltspunkt für die Giftigkeit des Schleimes für Fliegen entdecken. In orientierenden Laborversuchen gelang es auch nicht, Fliegen oder Fische mittels Sporenschleim abzutöten. In der referierenden Literatur befindet sich kein weiterer Hinweis auf die Giftigkeit der Stinkmorchel.

Die erste umfassende Arbeit über s t i c k s t o f f = und s c h w e f e l h a l t i g e Inhaltsstoffe des Hexeneies von *Phallus impudicus* legten LIST und REINHARD vor (17). Sie erweiterten die Reihe der Amine um Methylamin, Aethylamin und β -Phenylaethylamin, während sich das im reifen Pilz vorhandene Trimethylamin nicht nachweisen ließ. Des weiteren fanden sie Guanin und Adenin, Urocaninsäure, Imidazolylessigsäure, Histamin, Herzynin und Ergothionein, Cholin, Colamin, Tyramin und Putrescin. An Aminosäuren zeigten sich Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glykokoll, Alanin, Prolin, Tyrosin, Threonin, Valin, Leucin-Isoleucin, Arginin, Lysin und Histidin. Eine weitere Verbindung stimmte in ihren Eigenschaften weitgehend mit Cystathionin überein und lieferte beim Abbau α -Alanin und α -Aminobuttersäure. Außerdem konnten sie Ergosterin in größerer Menge isolieren.

In anderer Hinsicht wurde die Stinkmorchel durch eine Arbeit von MUSTIER und COULET (18) interessant. Die beiden Autoren wiesen in jungen Hexeneiern ein O-spezifisches Hämagglutinin nach, das besonders in der Gleba und im Endoperidium lokalisiert ist.

Über die elektrophoretische Trennung löslicher Proteine verschiedener Pilzarten, darunter auch das Hexenei von *Phallus impudicus*, berichteten 1966 KALAB und MATLOCHA (19). In einer weiteren Arbeit befassen sich 1967 LIST und BINDLER (20) mit dem Schleim der Hexeneivolvä. Danach handelt es sich um einen hauptsächlich aus Glucuronsäure bestehenden Polysaccharidschleim. An Neutralzuckern wurden im Hydrolysat Galactose, Glucose, Mannose, Xylose und Fucose nachgewiesen. Die Molekulargewichte der einzelnen Schleimfraktionen liegen zwischen 2100 und 6600.

Rheologisch zeigt der Schleim pseudoplastische Eigenschaften.

Von den speziellen Geruchstoffen der Stinkmorchel wurde der im Zuge dieser Arbeit nachgewiesene Phenylacetaldehyd etwa gleichzeitig auch von WIEGANDT (21) entdeckt.

ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG DER GERUCHSTOFFE

Im Jahre 1932 berichtete AYE (6) über Versuche, aus reifen "Stinkmorchelköpfen" ein ätherisches Öl mittels Wasserdampfdestillation zu gewinnen. Er erhielt durch Ausschütteln des Destillats mit Petroläther unter Kochsalzzusatz und Abdampfen des Lösungsmittels i.Vak. sehr wenig eines solchen Produktes, das schwefelhaltig, dessen Geruch aber gegenüber dem frischen Pilz verändert war. Aus diesem und den weiteren Angaben schien mir folgendes für meine Versuche beachtenswert:

1. Der Stinkmorchelgeruch verändert sich bei der Wasserdampfdestillation.
2. Nur ein Teil der möglicherweise vorhandenen Geruchsstoffe läßt sich aus dem Wasserdampfdestillat ausschütteln.
3. Die Geruchsstoffe können Schwefel enthalten.

Für die Sammlung und Konservierung von Pilzmaterial war weiterhin die Beobachtung des Autors bemerkenswert, daß der Geruch bei Aufbewahrung der Pilze unter Aethanol schon nach einigen Stunden verschwunden war.

Natürlich vorkommende Geruchsstoffe sind vielfach lipophiler Natur und lassen sich daher mit Hilfe von Lösungsmitteln aus dem umgebenden Medium extrahieren. Bei der Extraktion von in Wasser suspendierter Stinkmorchel-Gleba mit Äther erhielt ich grün gefärbte Extraktlösungen. Diese besaßen zwar

Anmerkung:

Im Bildtext zu den in der Arbeit abgebildeten Schichtchromatogrammen wurden folgende Abkürzungen verwendet:

P = Aufgetragene Probe

L = Fließmittelsystem

M = Schichtmaterial (Sorbens)

D = Detektionsmittel

S = Startlinie

F = Fließgrenze (in cm)

Punktiert gezeichnete Substanzen waren nur in sehr geringer Konzentration vorhanden.

den charakteristischen Geruch, der jedoch beim Abdunstenlassen einer kleinen Probe auf einem Uhrglas innerhalb einer Minute verschwunden war. Übrig blieb nur ein fettiger Rückstand mit verändertem, anhaftendem Geruch. Es war also nicht möglich, die Extraktlösungen zum Zwecke der weiteren Aufarbeitung einzuengen, ohne daß die wesentlichen flüchtigen Geruchsanteile mit übergingen. Beim Kondensieren des Destillats hätten die flüchtigen Anteile somit in großer Verdünnung in Äther vorgelegen. Die grüne Farbe des Extraktes sowie sein

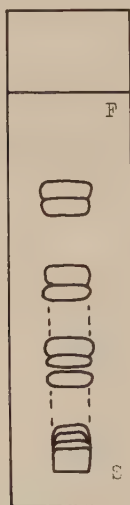


Abb. 4 P: Ätherischer Glebaextrakt
L: Benzol/Äthylacetat 9:1 (v/v)
M: Kieselgel GF₂₅₄
D: Joddampf
F: 16,5 cm

fettartiger Rückstand deuteten darauf hin, daß neben den Geruchsstoffen sehr viele andere Begleitstoffe aus dem Pilzmaterial extrahiert wurden. Diese Begleitstoffe erschwerten das Auffinden der Geruchs-Fractionen ganz erheblich, wie sich in Vorversuchen herausstellte. Das abgebildete Dünnschichtchromatogramm (Abb. 4) schien zwar recht eindeutige Trennungen zu ergeben, die Geruchsstoffe lagen aber in geringer Konzentration im Verhältnis zu den Begleitstoffen vor, so daß sie im Chromatogramm sowie unter den Säulenfraktionen

nur sehr schwer zu lokalisieren waren.

Als weitere Schwierigkeit kam die starke Neigung des Pilzmaterials hinzu, mit Äther oder anderen Lösungsmitteln recht stabile Emulsionen zu bilden.

Es erschien mir daher sinnvoll, die flüchtigen von den nicht flüchtigen Stoffen des Pilzes durch Vakuumdestillation des bei Raumtemperatur gehaltenen Pilzmaterials zu trennen. Diese Methode ist zur Gewinnung von Geruchs- und Aromastoffen u.a. schon von DIEMAIR und SCHAMS (22) beschrieben worden. Im Versuch wurde vom Hutgewebe befreite, in Wasser aufgenommene Gleba in einen Kolben überführt, hinter den drei Kältefallen geschaltet waren. Die dem Kolben nächste Falle wurde mit Aceton-Trockeneisgemisch auf etwa -70° , die zweite Falle mit flüssiger Luft gekühlt. Schon bei einem Vakuum von ca. 100 Torr schäumte das Pilzmaterial so stark, daß der Versuch unterbrochen werden mußte. Die Zugabe eines silikonhaltigen Antischaummittels brachte keinerlei Besserung. Es lag daher nahe, das Pilzmaterial vor Anlegen des Vakuums einzufrieren. Damit kam die Versuchsanordnung einer Gefrieretrocknung gleich, jedoch mit veränderter Schwerpunktlage, da es nicht auf das getrocknete Gut, sondern das Kondensat ankam. Es handelte sich demnach um eine Tieftemperatur-Vakuumdestillation. Ein Versuch, der mit 100 g Pilzmaterial durchgeführt wurde, verlief erfolgreich.

Zu der Frage, wie das wässrige Kondensat der Geruchstoffe aufzuarbeiten sei, konnte man ausgehend von der Tatsache, daß sich in natürlichen Geruch- und Duftstoffgemischen stets Carbonylverbindungen befinden, die relativ flüchtig sind, auch im Geruch der Stinkmorchel Carbonylverbindungen vermuten. Der Nachweis ließ sich mit Hilfe einer Petrischale führen, auf deren Boden die Gleba von 2 Hüten ausgebreitet worden war. Auf die Unterseite des Deckels wurden einige Tropfen 2,4-Dinitrophenylhydrazinreagens gebracht, hierauf die Schale mit dem Deckel verschlossen.

In dem Maße, wie sich der Gasraum in der Schale mit dem Geruch sättigte, trübten sich die Reagenstropfen. Nach eini-

gen Stunden hatten sich die Trübungen zu kleinen Kristallen aggregiert (Abb. 5).

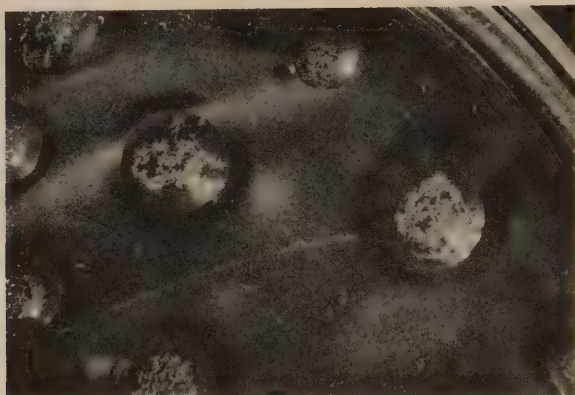


Abb. 5 Kristalle von 2,4-Dinitrophenylhydrazonen im Petrischalenversuch

Von den abgesaugten Kristallen wurden Dünnschichtchromatogramme angefertigt, die die 2,4-Dinitrophenylhydrazonbildung bestätigten.

Die Dünnschichtchromatogramme wurden mit den folgenden Fließmittelsystemen an Kieselgel GF₂₅₄ entwickelt:

Benzol/Äthylacetat	95:5 (v/v)
Benzol/Petroläther(40-70°)	3:1 (v/v) (Abb.6)
Cyclohexan/Chloroform/Äthylacetat	70:20:10 (v/v)

Die im Petrischalenversuch erhaltene Fraktion wurde von jedem der versuchten Fließmittel in zwei 2,4-Dinitrophenylhydrazonflecke getrennt.

Das bei der Tieftemperatur-Vakuumdestillation erhaltene wäßrige Kondensat wurde in noch gefrorenem Zustand mit

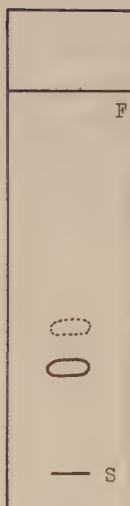
Abb. 6 P: 2,4-Dinitrophenylhydrazone (Petrischalenversuch)

L: Benzol/Petroläther (40-70°) 3:1 (v/v)

M: Kieselgel GF₂₅₄

D: Eigenfarbe

F: 16,5 cm



2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagens versetzt. Nach vollständiger Fällung ließ ich das Gemisch 24 Std. stehen, um auch etwa vorhandene Ketoverbindungen zu fällen. Der Niederschlag der 2,4-Dinitrophenylhydrazone war gelb bis orange, von kleineren tief roten Anteilen durchsetzt. *)

Die Fällungen aus den verschiedenen Kältefällen wurden vereinigt und dc untersucht. Mit dem schon erprobten (s.o.) Laufmittel Cyclohexan/Chloroform/Äthylacetat 70/20/10 (v/v) ließ sich das Gemisch in 4 Bestandteile neben dem am Startpunkt bleibenden Reagens auftrennen. Dabei waren die zwei Stoffe mit den größten Rf-Werten aber nur unvollständig voneinander getrennt (Abb. 7).

*) Bei den dunkelroten Anteilen handelt es sich um 2,4-Dinitrophenylhydrazin, das durch Hydrolyse des im Versuch in wäßriger Verdünnung vorliegenden 2,4-Dinitrophenylhydraziniumperchlorates entsteht.

Abb. 7 P: 2,4-Dinitrophenyl=
hydrazone (Vorversuch
zur Tieftemperatur-
Vakuumdestillation)
L: Cyclohexan/Chloroform/
Äthylacetat 70:20:10
M: Kieselgel GF²⁵⁴
D: Eigenfarbe
F: 16,5 cm



Die Substanzflecken wurden von oben nach unten von 1 bis 4 numeriert (Abb. 8).

Um für die präparative Trennung ein gut trennendes Fließmittel zu finden, wurden verschiedene Kombinationen getestet.

Fließmittel (v/v)	Trennung der Substanzflecke 1 und 2	Trennung der Substanzflecke 3 und 4
1. Cyclohexan 70 Chloroform 20 Äthylacetat 10	schlecht, z.T. aus= bleibend	gut
2. Cyclohexan 60 Äthylacetat 10 Chloroform 20	keine Trennung	gut
3. Cyclohexan 50 Chloroform 50 Aceton 1	keine Trennung	gut
4. Tetrachlor= kohlenstoff 100 n-Hexan 20 Äthylacetat 5	gut	mittelmäßig

Das 4. Fließmittel, das in Anlehnung an eine Arbeit von MEHLITZ, GIERCHNER und MINAS (23) entstand, ergab die beste Trennung (Abb. 8).

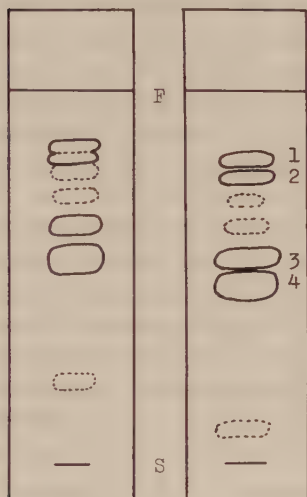


Abb. 8 wie Abb. 7
links Fließmittel Nr.1
(Tabelle)
rechts Fließmittel Nr.4
(Tabelle)
Beide Chromatogramme
wurden jeweils 3mal
entwickelt.

Zur Gewinnung einer größeren Menge des Geruchstoffkondensates wurden insgesamt 7,5 kg Pilzmaterial in Anteilen von durchschnittlich 470 g der oben beschriebenen Tieftemperatur-Vakuumdestillation unterworfen. Die gefällten 2,4-Dinitrophenylhydrazone wurden vereinigt und durch präparative Schichtchromatographie mit dem Fließmittel Tetrachlorkohlenstoff/n-Hexan/Äthylacetat 100/20/5 (v/v) am Kieselgel PF₂₅₄ getrennt.

Es wurden vier Substanzen in sehr unterschiedlicher Menge erhalten, die z.T. unter den gleichen Bedingungen rechromatographiert wurden. (Numerierung der Substanzen siehe im Dünnschichtchromatogramm Abb. 8.)

Da bei 2,4-Dinitrophenylhydrazonen die Gefahr der Mischkristallbildung besteht, wurden die isolierten Verbindungen

nach dem Auskristallisieren dünnschichtchromatographisch gegen 4 verschiedene Fließmittel auf Einheitlichkeit geprüft.

S u b s t a n z 4 erhielt ich in Form von gelben Nadeln durch Auskristallisieren aus aldehydfreiem, wäßrigem Äthanol in einer Menge von 215 mg. Der Schmelzpunkt betrug $164-165^{\circ}$. Bei Annahme eines einfachen Aldehyds sowie unter Berücksichtigung der Tatsache, daß diese Substanz mit dem kleinsten Rf-Wert zugleich wahrscheinlich die niedrigste C-Zahl der isolierten Substanzen hatte, konnte ich auf das Formaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon schließen. Nach Literaturangaben (24) beträgt sein Schmelzpunkt 167° . Der Mischschmelzpunkt vom Formaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon mit Substanz 4 ergab keine Depression. Die IR-Spektren des isolierten und des authentischen Derivates stimmten überein, ebenso die Rf-Werte im Dünnschichtchromatogramm mit verschiedenen Laufmitteln. In dem noch nicht mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagens behandelten Kondensat der Carbonylverbindungen ließ sich der Formaldehyd auch nach EEGRIWE mittels Chromotropsäure durch Farbreaktion spezifisch nachweisen (25).

S u b s t a n z 3 fiel in Form von rotbraunen Kristallen (aus aldehydfreiem Äthanol) in einer Menge von 100 mg an. Der Schmelzpunkt betrug $165-166^{\circ}$, im Dünnschichtchromatogramm bestand Übereinstimmung im Rf-Wert mit Acetaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon, dessen Schmelzpunkt in der Literatur mit 168° angegeben wird (24). Der Mischschmelzpunkt mit dem authentischen Derivat zeigte keine Depression.

S u b s t a n z 2 erhielt ich in einer Menge von 25 mg in Form kleiner, gelber Kristalle. Der Schmelzpunkt lag bei $119-121^{\circ}$. Ausgehend von der Annahme, daß auch diese Substanz Derivat eines Aldehyds sei, kamen als weitere homologe aliphatische Aldehyde nach dem Schmelzpunkt ihres 2,4-Dinitrophenylhydrazons n-Butyraldehyd (122°) und 3-Methylbutanal (Isovaleraldehyd, 123°) in Betracht. Dünnschichtchromato-

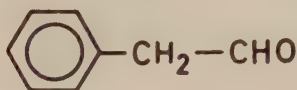
graphische Vergleiche der 3 Derivate ergaben jedoch, daß es sich bei Substanz 2 nicht um einen der beiden handeln konnte. Als Vertreter der nichtaliphatischen Aldehyde kam Phenylacetaldehyd in Betracht (Schmp. des 2,4-Dinitrophenylhydrazons: 121°) (47). Da die Interpretation von IR-Spektren von 2,4-Dinitrophenylhydrazonen wegen der stark ausgeprägten Banden des Reagensanteiles sehr wenig nützlich ist, konnte die aromatische Substitution spektral nicht erkannt werden. Aus dem UV-Spektrum entnahm ich nach DIEMAIR und SCHAMS (26) die Information, daß die mutmaßliche Aldehydgruppe weder α,β -ungesättigt war, noch an einem aromatischen System stehen konnte:

λ_{max} des 2,4-Dinitrophenylhydrazons:

354 nm (Chloroform) bzw. 356 nm (abs. Äthanol).

Das Massenspektrum der Substanz 2 machte schließlich die Annahme des Phenylacetaldehyds wahrscheinlich. Es ergab sich ein Molekularpeak von $m/e = 300$. Daraus errechnete sich für die freie Carbonylverbindung ein Molekulargewicht von 120 (Phenylacetaldehyd: 120,15).

Zum Beweis der Identität wurde das Phenylacetaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon^{*)} dargestellt. Es stimmte in Schmelzpunkt, dünnenschichtchromatographischem Verhalten und IR-Spektrum mit der isolierten Substanz überein.



Phenylacetaldehyd

*) Herrn Prof. Dr. H. Böhme danke ich für die Überlassung der benötigten Menge Phenylacetaldehyddimethylacetal.

S u b s t a n z 1 erhielt ich in einer Menge von 16 mg in Form roter Kristalle (aus aldehydfreiem Äthanol).

Der Schmelzpunkt der Substanz (199-202°) erinnerte an freies 2,4-Dinitrophenylhydrazin (Schmp. 200°), was aber auf Grund des Rf-Wertes der isolierten Substanz (s. Anm. S. 52) nicht möglich war. Der Mischschmelzpunkt beider Substanzen ergab überdies eine Depression. Aus der roten Farbe der isolierten Kristalle konnte das Derivat einer α,β -ungesättigten Carbonylverbindung oder Stellung der Carbonylgruppe in Konjugation zu einem aromatischen System angenommen werden. Diese Annahme bestätigte das UV-Spektrum, das in Einklang mit den Angaben von DIEMAIR und SCHAMS (26) maximale Absorption bei 375,9 nm aufwies. Des weiteren ergab sich aus dem Massenspektrum ein Molekulargewicht der Substanz von 326, woraus sich für die freie Carbonylverbindung ein solches von 146 errechnete. Es lag nahe, den Phenylacetaldehyd (M.G. ≈ 120) um die Struktureinheit $-\text{CH}=\text{CH}-$ (≈ 26) zu vergrößern. Die Berechtigung dieser Annahme bestätigte formal die Elementaranalyse, die auf die Summenformel $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4$ zutraf.

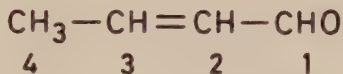
Zur weiteren Erkenntnis der Struktur der Verbindung wurde die freie Carbonylverbindung nach einigen erfolgreichen Vorversuchen aus dem Pilzmaterial gewonnen.

Zu diesem Zwecke wurden 4,5 kg Pilzmaterial in Anteilen von etwa 400 g mit Kieselgel zu einem trockenen Pulver verrieben und mit Äther am Rückfluß extrahiert. Die eingeeengte Lösung wurde durch präparative Schichtchromatographie mit dem Laufmittel Cyclohexan/Chloroform/Äthylacetat (70/20/10) (v/v) fraktioniert. Die Substanz 1 entsprechende freie Carbonylverbindung, größenordnungsmäßig 10-15 mg, wurde vom Kieselgel eluiert^{*)} und nach Herstellung einer kleinen Menge ihres 2,4-Dinitrophenylhydrazons dessen Identität mit Substanz 1 dc ermittelt. Das IR-Spektrum der isolierten Verbin-

*) Da die isolierte Verbindung nicht kristallin war und erfahrungsgemäß beim Abziehen des Lösungsmittels wegen ihrer Flüchtigkeit stets ein Teil verloren ging, wurde sie in Lösung gehalten, somit konnte die genaue Menge nicht ermittelt werden.

dung bestätigte durch die Lage der Carbonylbande (29) den Befund aus dem UV-Spektrum über die strukturelle Stellung der Carbonylgruppe ($5,9 \mu = 1695 \text{ cm}^{-1}$). Aus den Banden im Bereich $5-6 \mu$ ($2000-1667 \text{ cm}^{-1}$), $13,7 \mu$ (730 cm^{-1}) und $14,2 \mu$ (704 cm^{-1}) war die aromatische Substitution ersichtlich, als Substitutionstyp Monosubstitution wahrscheinlich. Schließlich deuteten die Banden bei $3,52 \mu$ (2841 cm^{-1}) und $3,68 \mu$ (2721 cm^{-1}) auf das Vorliegen eines Aldehyds.

Aus den vorliegenden Anhaltspunkten konnte daher auf einen aromatisch substituierten Crotonaldehyd geschlossen werden, wobei die Substitution prinzipiell in 2-, 3- oder 4-Stellung möglich war.



Crotonaldehyd

Die Substitution in 3-Stellung schied auf Grund der maximalen Absorption des 2,4-Dinitrophenylhydrazons im UV aus. Dieses Derivat hat sein Absorptionsmaximum bei 390 nm, da diese Struktur einer $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -ungesättigten analog ist. Somit blieb die Entscheidung zwischen den zwei verbleibenden Möglichkeiten, die bei Vorliegen einer größeren Menge des freien Aldehyds mit Hilfe eines KMR-Spektrums in eleganter Weise möglich gewesen wäre.

Zur endgültigen Klärung der Struktur unterwarf ich 5 mg des isolierten Aldehyds einer Oxydation mit Kaliumpermanganat nach BUTENANDT, STAMM und HECKER (27). Als Ergebnis für den in 4-Stellung substituierten Aldehyd war Phenylelessigsäure, für den in 2-Stellung substituierten entweder Phenylglyoxylsäure (Acetophenoncarbonsäure) oder, bei Decarboxylierung, Benzoesäure zu erwarten (Abb. 9 u. 10). Das Reaktionsprodukt, das wegen seiner geringen Menge nur untersucht werden

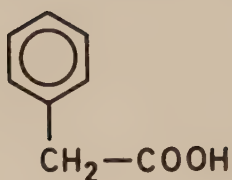
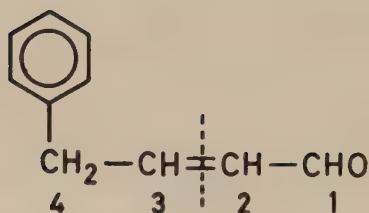


Abb. 9 Abbau von 4-
Phenyl-2-
buten-al-(1).
Erwartetes
Abbauprodukt:
Phenyllessig=
säure

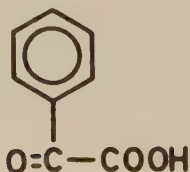
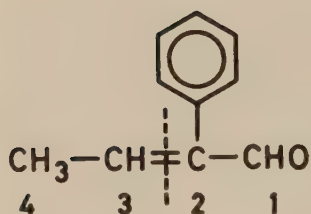
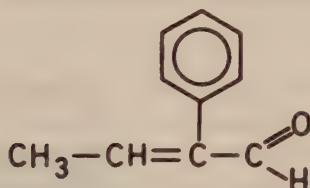


Abb. 10 Abbau von 2-
Phenyl-2-
buten-al-(1).
Erwartete Ab=
bauprodukte:
Acetophenon=
carbonsäure
oder
Benzoesäure

konnte, hatte im Dünnschichtchromatogramm mit dem Fließmittel n-Heptan/Eisessig 95/5 (v/v) fast den gleichen Rf-Wert wie die mit aufgetragene Phenylelessigsäure.

Da sich das gebildete Produkt gegen ein mittelpolares Laufmittel (Cyclohexan/Chloroform/Äthylacetat 70/20/10 (v/v)) aber ganz anders als eine Carbonsäure verhielt, wurde der Befund zweifelhaft. Aus diesem Grunde schien es mir angebracht, die vermuteten Substanzen zu synthetisieren. Nach KUHN und MICHEL (28) erhielt ich durch Kondensation von Phenylacetaldehyd und Acetaldehyd den α -Phenylcrotonaldehyd, der im IR-Spektrum des freien Aldehyds sowie seines 2,4-Dinitrophenylhydrazons und dessen Schmelzpunkt mit dem isolierten Naturstoff übereinstimmte. Der Mischschmelzpunkt der beiden 2,4-Dinitrophenylhydrazone ergab keine Depression.



α -Phenylcrotonaldehyd

Die Frage, um welches der möglichen geometrischen Isomeren des α -Phenylcrotonaldehyds es sich hier handelte, ließ sich nicht beantworten. Aus dem KMR-Spektrum des Syntheseproduktes (Abb. 11) konnte aufgrund der scharfen Signale für die Methylprotonen und das olefinische Proton lediglich angenommen werden, daß nur ein Isomeres vorlag.

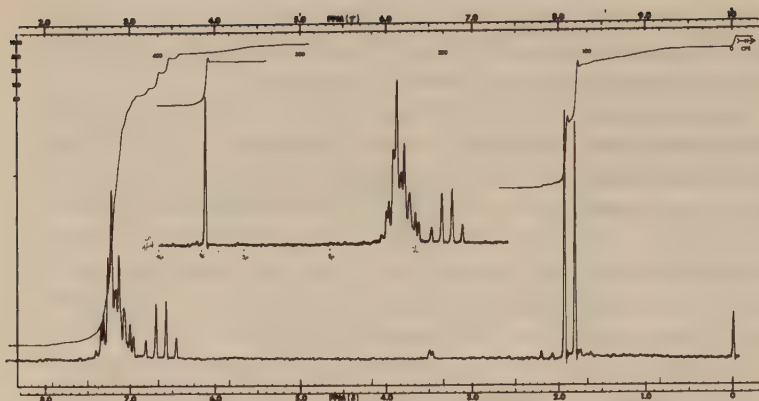


Abb. 11 KMR-Spektrum des synthetisierten α -Phenylcrotonaldehyds in CCl_4
Innerer Standard: Tetramethylsilan

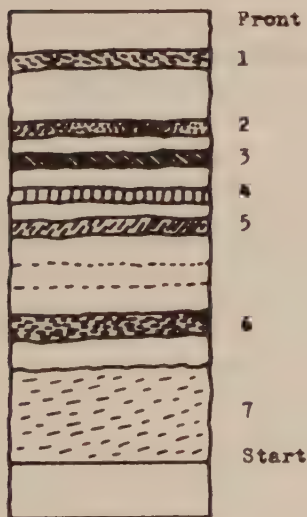
Die Methode der Geruchstoffisolierung, wie sie bei der Gewinnung des freien α -Phenylcrotonaldehyds angewandt wurde, machte gewisse Schwierigkeiten. In den Extrakten kamen zum einen sehr viele Extraktiv- und Begleitstoffe mit oft nur sehr geringen R_f -Unterschieden zu dem isolierten Stoff vor, zum zweiten war der zu isolierende Stoff in der Fülle seiner Begleiter oft nur schwer zu finden.

Abhilfe brachte die Wasserdampfdestillation. Diese Methode habe ich, wie zu Beginn angedeutet, zunächst eingedenk der Erfahrungen von AYE (6), die dieser über seine Versuche mit *Phallus impudicus* berichtete, nicht zur Gewinnung der Pilzgeruchstoffe herangezogen. AYE hatte durch Ausschütteln des Wasserdampfdestillates mit Petroläther bzw. Äther und Abdampfen des Lösungsmittels i. Vak. ein "Öl" erhalten, das "widerlich süßlich roch, kaum noch an den ursprünglichen Pilzgeruch erinnernd". Diese Erscheinung beruht darauf, daß das Wasserdampfdestillat für diesen Pilz eine Anreicherung der m i t t e l flüchtigen Stoffe darstellt. Die leichtflüchtigen und mit diesen auch die unangenehmen, charakte-

ristischen Komponenten des Pilzgeruches sind nicht mehr vorhanden. Trotzdem sind die Geruchstoffe des Wasserdampfdestillates für die eigentliche Gesamtgeruchsnote der Stinkmorchel von ausschlaggebender Bedeutung. Im folgenden habe ich sie näher untersucht.

Zu diesem Zwecke wurden 8 kg Pilzmaterial in Anteilen von etwa 400 g wiederum mit Kieselgel verrieben, die mit Äther erhaltenen Extrakte nach vorsichtigem Abziehen des Äthers der Wasserdampfdestillation unterworfen. Die Wasserdampfdestillate wurden mit Äther perforiert und die vereinigten, eingeeengten und entwässerten Ätherperforate der präparativen Schichtchromatographie zugeführt. Abb. 12 zeigt das Schema der Trennung. Das verwendete Fließmittel war Cyclohexan/Chloroform/Äthylacetat 70/20/5 (v/v). Die einzelnen

Abb. 12 Schema der schichtchromatographischen Trennung der wasserdampfflüchtigen Anteile.



Fraktionen wurden gesammelt und auf ihren Geruch hin untersucht. Die Substanzzone W_2 wurde zur Nachreinigung mit dem Laufmittel Benzol/Petroläther (35°) 3/1 (v/v) rechromatographiert. Nach ihrer Reaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Sprühreagens im Dünnschichtchromatogramm handelte es sich ebenfalls um eine Carbonylverbindung. Da über die Flüchtigkeit der Substanz noch nichts bekannt war, hielt ich sie zunächst in Lösung und fällte aus einem Drittel der Menge das 2,4-Dinitrophenylhydrazon. Da dieses chromatographisch nicht ganz rein war, wurde es mittels präparativer Schichtchromatographie an Kieselgel mit dem Fließmittel Benzol/Petroläther ($30-40^\circ$) 75/25 (v/v) nachgereinigt. Die erhaltene Fraktion wurde aus Äthanol auskristallisiert. Es ergaben sich rote oder reine Kristalle vom Schmelzpunkt $175-177^\circ$. Aus der roten Farbe der Kristalle konnte auch in diesem Falle α,β -Ungesättigtheit oder Ringkonjugation der Carbonylgruppe vermutet werden. Dieses wurde durch das UV-Spektrum ($\lambda_{\max} = 378 \text{ nm}$, abs. Äthanol) bestätigt. Das Massenspektrum ergab eine Molekularpeak bei $m/e = 390$. Für die freie Carbonylverbindung errechnete sich daraus ein Molekulargewicht von 210. Schließlich zeigte sich, daß die vorliegende Substanz kristallisierbar war. Das wegen der geringen Menge nicht umkristallisierte Produkt zeigte einen Schmelzpunkt von $68-70^\circ$. Im IR-Spektrum, das in normaler Konzentration aufgenommen worden war, fiel neben der Lage der Carbonylbande bei $5,95 \mu = 1681 \text{ cm}^{-1}$, die den aus dem UV-Spektrum erhaltenen Befund bestätigte, besonders die Intensität derjenigen Banden auf, die aromatische Strukturelemente anzeigen:

Banden im Bereich $5 - 6 \mu$ ($2000-1667 \text{ cm}^{-1}$) bei:

$5,1 \mu = 1961 \text{ cm}^{-1}$ (aufgespalten)

$5,27 \mu = 1898 \text{ cm}^{-1}$ (aufgespalten)

$5,49 \mu = 1821 \text{ cm}^{-1}$

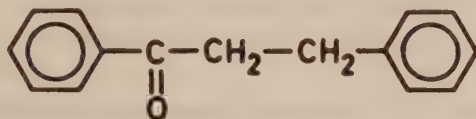
$5,65 \mu = 1770 \text{ cm}^{-1}$

$5,82 \mu = 1718 \text{ cm}^{-1}$

Banden im Bereich $13 - 15 \mu$ ($769-666 \text{ cm}^{-1}$) bei
 $13,35 \mu = 749 \text{ cm}^{-1}$
 $14,35 \mu = 697 \text{ cm}^{-1}$ (aufgespalten)

Aus der Intensität und teilweisen Aufspaltung der aromatischen Banden konnte auf eine 2fach aromatisch substituierte Carbonylverbindung geschlossen werden. Diese Vermutung bestätigte das KMR-Spektrum. Im aromatischen Bereich erscheint ein enges Multiplett bei $\delta = 7,18 \text{ ppm}$ für 5 Protonen. 5 weitere aromatische Protonen verteilen sich auf ein Multiplett von $\delta = 7,25-7,5 \text{ ppm}$ (3 Protonen) und ein Multiplett von $\delta = 7,75-8,0 \text{ ppm}$ (2 Protonen). Weiterhin erscheint ein doppeltes Triplet im Bereich von $\delta = 2,9-3,3 \text{ ppm}$ für 4 aliphatische Protonen. Ein Aldehydproton fehlt.

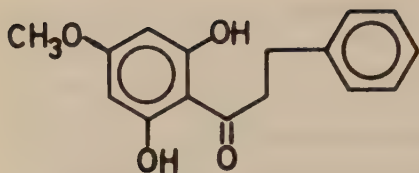
Aus den angeführten Kriterien ergab sich als Strukturvorschlag folgende Verbindung:



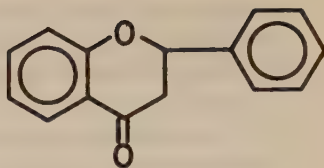
Es handelt sich um das ω -Benzylacetophenon, im Hinblick auf die Gruppe der Chalcone auch Dihydrochalcon genannt.

Zum Beweis der Struktur wurde Benzalacetophenon mit Platindioxidkatalysator in Essigester nach (30) katalytisch hydriert, bis die einer Doppelbindung entsprechende Wassermenge aufgenommen war. Das Reaktionsprodukt ergab beim Auskristallisieren aus Äthanol farblose Kristalle vom Schmelzpunkt $70-71^\circ$. Die isolierte und die synthetisierte Verbindung stimmen in IR-Spektrum, KMR-Spektrum und Schmelzpunkt überein. Der Mischschmelzpunkt ergab keine Depression.

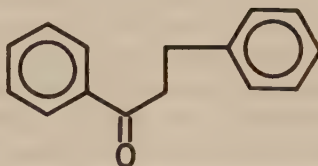
Die isolierte Verbindung stellt den Grundkörper der Chalcone dar und steht vielleicht in biogenetischer Beziehung zu den Flavonoiden (Abb. 13).



A S E B O G E N I N



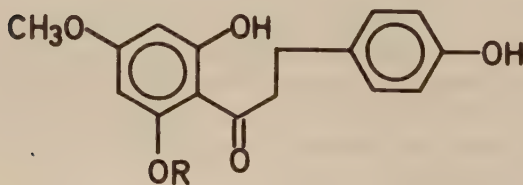
F L A V A N O N



D I H Y D R O C H A L C O N

Abb. 13

"Chalcone" sind den "Flavonen" entsprechende Naturstoffe. Das abgebildete Asebogenin ist nach GEISSMAN (31) eines der wenigen bisher bekannten "Chalcone", die als Grundkörper das Dihydrochalcon besitzen. Das entsprechende genuine Glukosid, Asebotin, ist eine toxische Verbindung, die aus *Kalmia latifolia* und auch aus *Andromeda japonica* isoliert wurde. Das Asebotin ist ein 4,2',6'-Trihydroxy-4'-methoxydihydrochalcon-2-glucosid (Abb. 14).



A S E B O T I N (R = Glucose)

Abb. 14

Dihydrochalcon besitzt trotz seiner kristallinen Eigenschaften eine charakteristisch frische, helle Geruchsnote und gehört damit zu dem haftenden, angenehmen Geruchsanteil des Stinkmorchelgeruches.

KARRER (32) führt das unsubstituierte Dihydrochalcon unter den Naturstoffen nicht auf. Auch in der referierenden Literatur der letzten Jahre befindet sich kein Hinweis auf das Vorkommen dieser Substanz in der Natur.

Die bei den bisher beschriebenen Arbeiten verwendeten Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie an Kieselgel G waren in ihrer Polarität so, daß die bearbeiteten Stoffe stets im mittleren Bereich der Trennung lagen. Da diese Stoffe aromatisch substituierte Aldehyde bzw. deren 2,4-Dinitrophenylhydrazone waren, handelte es sich um mittelpolare Laufmittel. Bei einfachen Substanzklassen kann unter solchen Bedingungen der Rf-Bereich der einzelnen Klassen in etwa vorausgesagt werden. Nach fallenden Rf-Werten geordnet, entsteht folgende Reihe:

Kohlenwasserstoffe
Carbonylverbindungen
Alkohole
Carbonsäuren

Bei Gemischen unbekannter Zusammensetzung kann man demnach unter den vorgegebenen Bedingungen aus dem Rf-Wert einzelner Komponenten gewisse Rückschlüsse auf deren Polarität ziehen. Bei der Substanzzone 7 des Wasserdampfdestillats mußte es sich nach dieser Erkenntnis um die Substanz oder Substanzgruppe mit der stärksten Polarität der getrennten Stoffe handeln. Daß diese Zone außerdem "nachsleppte", d.h. sich vom Startpunkt nicht sauber abtrennte, war ein weiterer Hinweis dafür, daß hier Carbonsäuren erwartet werden konnten. Die Tatsache, daß diese Zone geruchlich interessant war, gab den Anstoß für ihre nähere Untersuchung.

Fettsäuren lassen sich bekanntlich als Hydroxamate sehr

elegant chromatographieren, da diese mit Fe^{3+} -Ionen eine Rotfärbung ergeben. Eine Probe des aus Zone 7 der Wasserdampfdestillation erhaltenen Eluats wurde nach weitgehender Entfernung des Lösungsmittels mit Bortrifluorid-Methanolgemisch nach METCALFE und SCHMITZ (33) verestert und hierauf die Methylester nach BUTENANDT et al. (27) mit Hydroxylamin in die Hydroxamsäuren überführt. Die Trennung erfolgte mit dem Fließmittel Amylalkohol/Eisessig/Wasser 4/1/5 (v/v) (Oberphase) nach (34), jedoch nicht an Papier, sondern Cellulose-Dünnschicht. Nach Detektion zeigten sich 5 Flecke mit den Rf-Werten 0,93, 0,8, 0,64, 0,45 und 0,14 (Abb. 15).

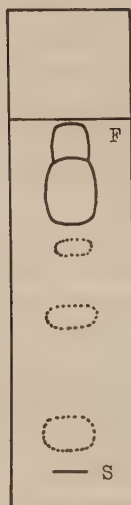
Abb. 15 P: Carbonsäurehydroxamate
der Zone 7

L: Amylalkohol/Eisessig/
Wasser 4:1:5 (Oberphase)

M: Cellulose MN 300

D: FeCl_3 -Sprühreagens

F: 15,5 cm



Bei dem letztgenannten Fleck handelte es sich um überschüssiges Hydroxalaminreagens, bei dem nächsthöheren (0,45) um Essigsäurehydroxamat, die Essigsäure stammte jedoch nicht aus dem Pilz, sondern aus dem verwendeten Äthylacetat (zum Nachweis der Essigsäure wurde noch ein eigener Ansatz durchgeführt). Der Fleck mit dem Rf-Wert 0,93 war schon ohne Detek=

tion als braunes Produkt sichtbar und wahrscheinlich eine höhermolekulare Verunreinigung. Hauptbestandteil war zweifellos der Fleck mit dem Rf-Wert 0,8, während der darunter folgende (0,64) nur sehr schwach war.

Der Hauptbestandteil stimmte im Rf-Wert mit Valeriansäure- und iso-Valeriansäurehydroxamat, die nicht getrennt wurden, überein. Um die Identität dieses Hydroxamates festzustellen, wurde die beschriebene Trennung auf präparative Celluloseschichtplatten übertragen. 0,5 g der Zone 7 wurden wie oben beschrieben verestert und zur Hydroxamsäure umgesetzt. Nach beendeter Entwicklung der Chromatogramme wurde die entsprechende Zone gesammelt und die Hydroxamsäure von der Cellulose eluiert. Aus Äthylacetat erhielt ich schwach rosa gefärbte Kristalle, deren Schmelzpunkt $140-142^{\circ}$ betrug. Da die Schmelzpunkte der Hydroxamate aliphatischer Carbonsäuren in einem Bereich von 88° (Essigsäure) bis $102,5^{\circ}$ (Stearinsäure) liegen (36) und der Schmelzpunkt der Isovalerhydroxamsäure in der Literatur mit $73,5-76^{\circ}$ angegeben wird (35), schied diese Möglichkeit aus. Aus dem IR-Spektrum des isolierten Hydroxamates konnte überdies das Vorliegen einer aromatischen Substitution erkannt werden.

Bandenbereiche: 5 - 6 μ ($2000-1667\text{ cm}^{-1}$):

5 Banden (Monosubstitution)
(nur bei sehr intensivem Spektrum)

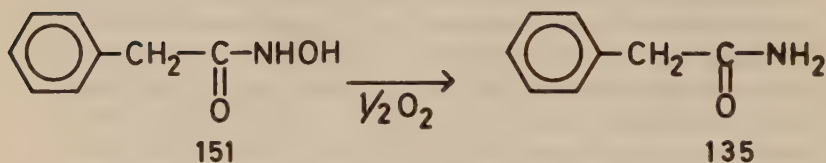
13 - 15 μ ($769-666\text{ cm}^{-1}$):

Bande bei 13,92 μ = 718 cm^{-1}
Bande bei 14,4 μ = 694 cm^{-1}

Auf Grund des Vorliegens des leicht oxydablen Phenylacetaldehyds im Pilzmaterial war Phenylelessigsäure denkbar, worauf auch der Schmelzpunkt ihres Hydroxamates hindeutete ($139-141^{\circ}$), nach (37). Das Massenspektrum ergab jedoch statt des erwarteten Molekulargewichtes von 151 nur ein solches von 135.

Zur Klärung dieser Frage wurde eine gaschromatographische Trennung des mit Methanol veresterten Substanzgemisches der Zone 7 vorgenommen. Der Hauptbestandteil der Tren-

nung wurde mittels präparativer Gaschromatographie in einer Menge von 240 mg gewonnen. Nach einer weiteren gaschromatographischen Reinigung der Substanz stimmte das aufgenommene IR-Spektrum mit dem des Phenylelessigsäuremethylesters überein. Des weiteren ergab die massenspektrometrische Analyse von einer Probe Phenylelessigsäurehydroxamat, das zum Vergleich hergestellt worden war, ebenfalls einen Molekularpeak bei $m/e = 135$. Diese Erscheinung kann evtl. damit erklärt werden, daß sich die Hydroxamsäure im Massenspektrometer unter Abgabe von $1/2 O_2$ zum Säureamid stabilisiert:



Neben den Derivaten von Essigsäure und Phenylelessigsäure trat im Dünnschichtchromatogramm der niederen Carbonsäurehydroxamate stets noch ein dritter Fleck auf, nach der Fleckengröße in sehr geringer Konzentration. Mit den Fließmitteln Amylalkohol/Eisessig/Wasser 4:1:5 (v/v) Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5 (v/v) (38) Propanol/5 n NH_3 in H_2O /10% $(NH_4)_2CO_3$ in H_2O 6:1:2 (v/v) (38) war stets ein gleicher R_f -Wert mit Propionsäurehydroxamat festzustellen. Um den Nachweis auch auf andere Weise zu führen, wurden die freien Carbonsäuren gaschromatographisch getrennt. Dabei ließen sich Essigsäure und Propionsäure auf Grund ihrer Retentionszeit nachweisen. Da Äthylacetat von der verwendeten Säule nur wenig zurückgehalten und von freier Essigsäure eindeutig getrennt wird, war bei

dieser Art des Nachweises das Auftreten der Essigsäure wieder spezifisch. Essigsäure wurde, wie ich schon zu Beginn der Arbeit berichtet habe, bereits 1811 von BRACONNOT in Form ihrer Salze in der Stinkmorchel nachgewiesen.

Die Vermutung, daß der charakteristische Geruch der Stinkmorchel durch Schwefelverbindungen erzeugt wird, geht wohl auf die exakte und dennoch phantasievolle Beobachtung der Naturforscher der deskriptiven Ära der Botanik zurück. Die Tatsache, daß leicht flüchtige Schwefelverbindungen z.T. als charakteristischer Geruch für den Menschen noch in einer Konzentration von weniger als 2 ppm (39) wahrnehmbar sind, deutet auf die Notwendigkeit hin, sie zum Zwecke des Nachweises stark anzureichern. Speziell in Bezug auf die Stinkmorchel konnte man schon deshalb mit dem Vorliegen leicht flüchtiger, stark riechender Verbindungen rechnen, weil das Pilzmaterial auch im tiefgefrorenen Zustand noch einen deutlichen Geruch aufweist.

Von den Versuchen, bei denen das Pilzmaterial direkt - und nicht die zuvor gewonnenen Extrakte - der Wasserdampfdestillation unterworfen wurden, war bekannt, daß sich dabei ein starker Geruch entbindet, der im Destillat nicht oder nur in geringer Menge gefunden wird. Mit Hilfe nachgeschalteter Kältefallen, die mit flüssiger Luft gekühlt wurden, ließ sich ein Kondensat gewinnen, das von außerordentlicher Geruchsintensität war. Auf Grund der Versuchsanordnung enthielt es jedoch stets neben Kohlendioxid auch Wasser kondensiert, was die weitere Behandlung solcher Kondensate sehr erschwerte, zumal über die sonstigen Komponenten nichts bekannt war. Es schien mir prinzipiell wiederum sinnvoll zu sein, schwerflüchtige Derivate der vorliegenden Stoffe herzustellen, dazu mußte zunächst aber etwas über ihre Natur und damit über ihre funktionellen Gruppen bekannt sein. In weiteren Vorversuchen wurde die Wasserdampfdestillationsanlage zunächst mit Stickstoff begast. Der Stickstoff diente zum einen als Inertgas, wichtiger aber

war die Vergrößerung des Durchsatzes leicht flüchtiger Bestandteile durch die Apparatur, die in der Hitze aus dem Filzmaterial offenbar erst allmählich freigesetzt werden. Es zeigte sich, daß die leichtflüchtige Fraktion in 40%iger Kalilauge (40) absorbierbar war, aus der sie anschließend mit verd. Schwefelsäure wieder freigesetzt werden konnte. Diese Tatsache deutete auf das Vorliegen von Thiolgruppen hin. Mercaptane können nach DAY und PATTON (41) mittels 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol in die schwerflüchtigen 2,4-Dinitrophenylsulfide überführt werden. Der Umstand, daß die Mercaptane im vorliegenden Versuch gasförmig anfielen, erwies sich als günstig. Die Freisetzung mit verdünnter Schwefelsäure geschah in einem Dreihalskolben mit vorgelegter Säure, in den ich die die Schwefelverbindungen enthaltende Kalilauge eintropfen ließ. Die freigesetzten Verbindungen wurden mittels eines Stickstoffstroms in eine mit pyridinhaltigem 1-Fluor-2,4-dinitrobenzolreagens beschickte Vorlage überführt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Reagenslösung am Rotationsverdampfer eingeeengt und durch präparative Schichtchromatographie an Kieselgel mit dem Fließmittelsystem Benzol/Petroläther aufgetrennt. Gegenüber einem Blind-

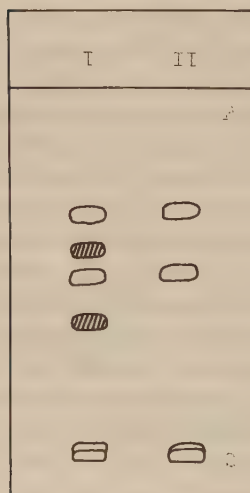


Abb. 16 P: 2,4-Dinitrophenylat-Reaktionsgemisch (I)
2,4-Dinitrophenylat-Blindversuch (II)
L: Benzol/Petroläther (35°) 3:1 (v/v)
M: Kieselgel GF₂₅₄
D: Eigenfarbe und UV-Licht
F: 16,5 cm

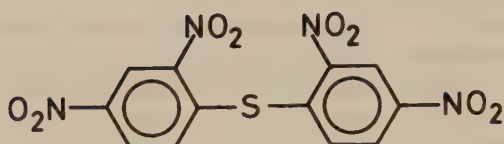
versuch mit reinem Reagens traten im Dünnschichtchromatogramm zwei zusätzliche hellgelb gefärbte Zonen auf (Abb.16).

Zur Gewinnung einer größeren Menge der 2,4-Dinitrophenylsulfide wurden 2,2 kg Pilzmaterial nach Homogenisieren in der beschriebenen Weise verarbeitet. Aus den erwähnten gelbgefärbten Zonen wurden Kristalle erhalten, die sich in beiden Fällen elementaranalytisch als schwefelhaltig erwiesen.

Substanzzone 8-D ergab gelbe Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 128-129°. Im Dünnschichtchromatogramm hatte der dieser Substanz zugeordnete Fleck stets einen etwas niedrigeren Rf-Wert als das zum Vergleich mit aufgetragene Äthyl-2,4-dinitrophenyl-sulfid. Diese Kriterien deuteten auf das Vorliegen von Methyl-2,4-dinitrophenyl-sulfid. (Schmelzpunkt 127-128°).

Die Vermutung bestätigte sich beim Vergleich der Substanz mit authentischem Methyl-2,4-dinitrophenyl-sulfid. Die IR-Spektren stimmten überein. Der Mischschmelzpunkt der beiden Substanzen ergab keine Depression.

Die Substanzzone 9-D lieferte ebenfalls gelbe Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 198-199°. Merkwürdig war zunächst, daß diese Substanz im Dünnschichtchromatogramm stets einen kleineren Rf-Wert hatte als Methyl-2,4-dinitrophenyl-sulfid. Da das Methylmercaptan-Derivat die kürzeste Kettenlänge dieser Reihe besitzt, und somit auch den niedrigsten Rf-Wert, war es nicht möglich, daß dieses Verhalten durch die Kettenlänge des unbekannten funktionellen Molekülteiles hervorgerufen wurde. Eine zusätzliche polare Gruppe aber, die dieses Verhalten erklärt hätte, war im IR-Spektrum der Substanz nicht vorhanden. Ferner war die Substanz im heißen Äthanol nur sehr schwer zu lösen, während die Mercaptandерivate in Äthanol gut löslich sind. Das Massenspektrum brachte mit einem Molekülpeak bei $m/e = 366$ eine Erklärung für das Verhalten dieser Substanz. Danach handelte es sich offenbar um das Bis-(2,4-dinitrophenyl)-sulfid.



Die Bildung dieser Substanz konnte nur mit dem Vorhandensein von Schwefelwasserstoff in der flüchtigen Pilzphase erklärt werden. Zur Bestätigung der Annahme wurde unter gleichen Bedingungen 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol mit Schwefelwasserstoffgas umgesetzt. Auch hier erhielt ich gelbe Kristalle vom Schmelzpunkt 198-199° *). Der Mischschmelzpunkt mit dem Naturstoffderivat zeigte keine Depression. Die IR-Spektren der beiden Verbindungen stimmten überein.

Zur Bestätigung der Anwesenheit des Schwefelwasserstoffes in der Pilzphase wurde in Anlehnung an E. FISCHER (42) N,N-Dimethyl-p-phenylendiamin mit dem Gemisch der isolierten Schwefelverbindungen umgesetzt und das gebildete Methylenblau dünnschichtchromatographisch nachgewiesen. Im Vergleichsversuch zeigte Methylmercaptan diese Reaktion nicht.

*) Eine entsprechende Reaktion mit 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol, die zum gleichen Produkt führt, beschrieben Th. ZINKE und G. WEISSPFENNIG, J. prakt. Chem. 85, 216 (1912)

ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG ANDERER INHALTSSTOFFE

Bei einem Vorversuch, bei dem 200,0 g gefriergetrocknetes Pilzmaterial in der Soxhletapparatur zunächst mit Äther und dann mit Aceton extrahiert wurde, trübten sich die Extraktlösungen.

Die Trübungen sedimentierten über Nacht zu zähen, in organischen Lösungsmitteln unlöslichen Niederschlägen. Eine Probe war in Wasser löslich und schmeckte süß. Sie ergab eine positive Fermentreaktion auf Glucose. Im papierchromatographischen Vergleich mit Glucose und verschiedenen anderen Mono- und Disacchariden zeigte sich nur das Vorkommen von Glucose in der Pilzfraktion (Abb. 17).

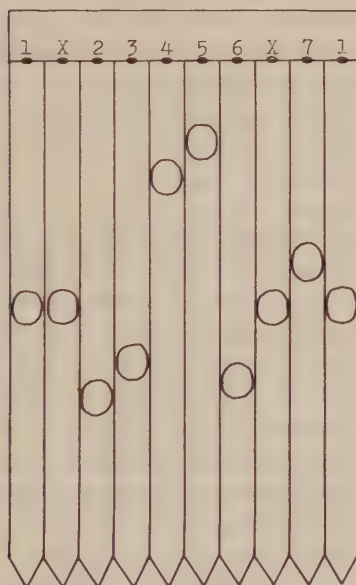


Abb. 17 Papierchromatographische Trennung von Zuckern.

X = isolierte Zuckerfraktion

1 = Glucose

2 = Arabinose

3 = Fructose

4 = Maltose

5 = Lactose

6 = Mannose

7 = Galactose

Papier; S&S 2043
b Mgl

Fließmittel:

Butanol/Pyridin/
Wasser 10:3:3

Laufzeit: 73 Std.
(Durchlaufchromatogramm)

Detektion: Anilinphthalat

Ein aus dem Niederschlag gefälltes Osazon zeigte nach Umkristallisieren aus Äthanol einen Schmelzpunkt von 204-205°. Mit authentischem Glucosazon ergab sich im Mischschmelzpunkt keine Depression.

Glucose wurde schon 1883 von RATHAY und HAAS (12) in der Stinkmorchel nachgewiesen.

Bei der Gewinnung des freien α -Phenylcrotonaldehyds mittels präparativer Schichtchromatographie aus dem ätherischen Pilzextrakt fiel eine Fraktion an, die wegen ihres Geruches ebenfalls interessant zu sein schien. Nach weiterer Reinigung ging zwar der Geruch, der offenbar auf einen in geringer Konzentration vorliegenden Begleitstoff zurückging, verloren. Dennoch wurde die Fraktion näher untersucht.

Das IR-Spektrum der dünnschichtchromatographisch reinen und einheitlichen Substanz ließ aufgrund einer sehr intensiven, aber schmalen Bandengruppe bei 3,3-3,5 μ (3030-2857 cm^{-1}) auf ein größeres Molekül schließen. Die intensive Absorption bei 5,75 μ (= 1739 cm^{-1}) konnte, da die Substanz im Dünnschichtchromatogramm beim Besprühen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung keine Reaktion zeigte, und im IR-Spektrum auch keine OH-Bande vorhanden war, nur auf eine Estergruppierung zurückzuführen sein.

Zum Zwecke der Esterspaltung wurde die Substanz mit 0,5 n Kalilauge (äthanolisch) solange am Rückfluß erhitzt, bis die ölige Phase vollständig in Lösung gegangen war. Nach Abkühlen wurde zur Abtrennung der mutmaßlichen Alkoholkomponente zunächst mit Äther, hierauf nach Ansäuern mit verd. Schwefelsäure die saure Komponente mit Chloroform extrahiert. Im Dünnschichtchromatogramm zeigte sich die Esterspaltung durch eine starke Verkleinerung der R_f -Werte der erhaltenen Fraktionen - im Vergleich zur Ausgangssubstanz. Die nach Ansäuern erhaltene Fraktion zeigte zudem das für längerkettige Fettsäuren am Kieselgel G typische "Nachschleppen". Da dieser Fleck sich außerdem mit Joddämpfen sehr intensiv färbte, konnte man an eine ungesättigte Fett-

säure denken. Im Vergleich mit Ölsäure^{*)} zeigte das IR-Spektrum der sauren Esterkomponente zwar Übereinstimmung, eine Abgrenzung nur gegen die höher ungesättigte Linolensäure war auf diese Weise jedoch nicht möglich, da die IR-Spektren der betreffenden Säuren sich nur sehr wenig unterscheiden.

Die Alkoholkomponente ließ sich sehr leicht auskristallisieren und erinnerte in dieser Eigenschaft wie auch in ihrer charakteristischen Reaktion mit Antimon(V)-chlorid im Dünnschichtchromatogramm an Ergosterin. Auch wies sie dünn-schichtchromatographisch den gleichen Rf-Wert wie Ergosterin auf. Der Schmelzpunkt lag aber bei 174-176°, Ergosterin hat einen solchen von 160-163° (32). Identität der Verbindungen konnte demnach nicht bestehen, obwohl das IR-Spektrum dem des Ergosterins ähnlich war. Nach dem Schmelzpunkt des isolierten Produktes kamen an ähnlichen Sterinen nur 5-Dihydroergosterin in Frage, dessen Schmelzpunkt nach KARRER (32) 172-175° beträgt. Ergosterin und 5-Dihydroergosterin unterscheiden sich bezüglich der physikalischen Eigenschaften wesentlich in ihrem spezifischen Drehwinkel (32):

5-Dihydroergosterin $[\alpha]_D^{20} = -19 \text{ bis } -20^\circ \text{ (CHCl}_3\text{)}$

Ergosterin $[\alpha]_D^{20} = -133^\circ \text{ (CHCl}_3\text{)}$

Im Versuch wurde mit der gesamten Sterinfraktion (17,7 mg) ein spezifischer Drehwinkel von -16 bis -17° gefunden.

Außerdem erwies das Massenspektrum einen Mutterpeak bei m/e = 398. Damit wurde die isolierte Substanz deutlich von Ergosterin (396) unterschieden. Ein in der Literatur veröffentlichtes IR-Spektrum von 5-Dihydroergosterin (43) zeigte gute Übereinstimmungen mit dem aufgenommenen Spektrum.

Zur Beantwortung der Frage, ob der Säureanteil des Sterinesters einfach oder mehrfach ungesättigt war, wurde eine gaschromatographische Trennung durchgeführt. Leider hatte sich die aus dem Ester erhaltene Säure aber völlig zersetzt, so daß diese Frage nicht mehr geklärt werden konnte. Die Tatsache der Zersetzung spricht allerdings für das Vorliegen einer mehrfach ungesättigten Fettsäure.

*) Die Kettenlänge (C₁₈) war gaschromatographisch bestimmt worden.

DISKUSSION

Der Geruch der Stinkmorchelgleba ist nicht in allen Stadien ihres Daseins gleich.

Nach dem Aufgehen des Pilzes ist die Gleba zunächst matt-grün und fest. Der Geruch ist sehr schwach, rettichartig und nicht anders als der eines aufgeschnittenen Hexeneies.

Die hellgrüne Gleba beginnt alsbald, an einzelnen Stellen unter Dunkelfärbung schleimig zu zerfließen. Diese Reaktion schreitet in kurzer Zeit über den ganzen Pilzhut fort.

Von diesem Zeitpunkt an wird der aasartige, charakteristische Geruch freigesetzt, der zur Anlockung von Insekten dient. Nach einigen Stunden sind die aasartigen, leicht flüchtigen Geruchsanteile verströmt und es bleibt ein veränderter, haftender Geruch zurück.

Die chemische Analyse des Pilzgeruches, Gegenstand dieser Arbeit, bestätigt diesen Ablauf. Von den gefundenen Stoffen sind die folgenden als Geruchsträger anzusehen.

Verbindung	Geruch
Methylmercaptan	nach faulem Kohl
Schwefelwasserstoff	nach Fäulnis
Phenylacetaldehyd	hell, Grasgeruch, Grünnote
α -Phenylcrotonaldehyd	dunkler, erdig
Acetaldehyd	stechend
Formaldehyd	charakteristisch stechend
Dihydrochalcon	hell, frisch
Propionsäure	stechend
Essigsäure	sauer
Phenylelessigsäure	sehr süßlich

Die beiden erstgenannten, Methylmercaptan und Schwefelwasserstoff, bedingen den eigentlichen Aasgeruch, der auf-

grund seines Charakters, seiner Flüchtigkeit und Intensität zur Fernanlockung der Insekten zu dienen scheint (44). Sehr charakteristisch für den Geruch der reifen Gleba ist weiterhin Phenylacetaldehyd, der zusammen mit α -Phenylcrotonaldehyd, Phenyllessigsäure und Dihydrochalcon den haftenden Geruch bedingt, der im späteren Stadium, nach Verflüchtigung des Aasgeruches überwiegt.

Neben der dargestellten Änderung des Pilzgeruches, die durch die unterschiedliche Flüchtigkeit der Geruchskomponenten bedingt ist, scheinen auch Veränderungen chemischer Art einzutreten, wie man aus dem gleichzeitigen Auftreten von Phenylacetaldehyd und Phenyllessigsäure schließen kann. Eine Beobachtung, die bei der Isolierung von α -Phenylcrotonaldehyd gemacht wurde, macht solche Veränderungen ebenfalls wahrscheinlich. Dieser Aldehyd, im chromatographisch reinen Zustand isoliert, zeigte schon nach mehrtägigem Stehen an der Luft im Dünnschichtchromatogramm eine Anhäufung neuer Substanzflecke.

Neben ihrer Funktion als Geruchstoffe scheinen einige der vorkommenden Aldehyde und Carbonsäuren noch in anderer Hinsicht für den Pilz von Bedeutung zu sein. Die zerfließende Gleba wäre mit der Anwesenheit von Polysaccharidschleim, Sporen, Wasser und Glucose ein ideales Substrat für andere Pilze, wenn sie nicht durch die enthaltenen Aldehyde und Carbonsäuren auch fungistatische Eigenschaften hätte.

Beim Sammeln der Pilze konnte ich Schimmel auf Stinkmorchelgleba nur äußerst selten beobachten. Bei intakten Pilzen tritt der Schimmel auf der Gleba nur an den Resten der Volva auf, die beim Aufgehen nicht vollständig abgestreift werden. Der Polysaccharidschleim der Volva scheint ein gutes Kulturmedium zu sein.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Sporen der Stinkmorchel, *Phallus impudicus* L., werden auf endozoischem Wege verbreitet. Die Anlockung der Insekten geschieht durch einen aasartigen Geruch, der vom reifen Sporenschleim verströmt wird.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die einzelnen Geruchstoffe chemisch näher zu charakterisieren.

Die Anreicherung geschah durch Tieftemperatur-Vakuumdestillation, Extraktion bzw. Wasserdampfdestillation. Flüchtige Geruchstoffe wurden in nicht flüchtige Derivate übergeführt.

Die reinen Stoffe bzw. ihre Derivate wurden aus den Gemischen durch präparative Schicht- oder Gaschromatographie gewonnen. Nach den bekannten chemischen und physikalischen Methoden der Strukturanalyse wurden als Verbindungen mit geruchlichen Eigenschaften die folgenden nachgewiesen: Methylmercaptan, Schwefelwasserstoff, Phenylacetaldehyd, α -Phenylcrotonaldehyd, Dihydrochalcon, Phenylelessigsäure, Acetaldehyd, Essigsäure, Propionsäure, Formaldehyd.

Außerdem wurden Glucose und ein Fettsäureester des 5-Dihydroergosterins isoliert.

EXPERIMENTELLER TEIL

Allgemeine Hinweise

Das verwendete Pilzmaterial wurde in den Jahren 1965 und 1966 in der Umgebung von Marburg/Lahn bzw. Münster/Westfalen gesammelt. Teilweise wurden auch Hexeneier eingebracht und im Labor bis zum Aufgehen auf Walderde oder Eiertragen feucht gehalten. Die reife Gleba mit dem zugehörigen Hutgewebe, die, soweit nicht anders angegeben, stets bei den Versuchen Verwendung fand, wurde sofort nach dem Einsammeln in verschlossenen Behältern tiefgefroren und bei -20°C aufbewahrt.

Das Auftauen geschah unmittelbar vor dem Gebrauch.

Alle verwendeten Lösungsmittel, die nicht von analytischer Qualität waren, wurden vor dem Gebrauch destilliert. Äthanol, das im Rahmen der Arbeiten an den 2,4-Dinitrophenylhydrazonen gebraucht wurde, wurde zuvor 30 Min. lang unter Zusatz von 2,4-Dinitrophenylhydrazin und Phosphorsäure unter Rückfluß erhitzt, hierauf vom Reaktionsgemisch abdestilliert.

Äther wurde zur Zerstörung der Peroxide und Entwässerung mit Eisen(II)-sulfat und festem Kaliumhydroxid behandelt und über Eisen(II)-sulfat destilliert.

Die Schmelzpunkte wurden mit Hilfe eines Leitz-Heiztischmikroskopes unter Verwendung von Anschütz-Thermometern bestimmt.

Die CH-, N- und S-Bestimmungen wurden im hiesigen Institut für Pharmazeutische Chemie und Lebensmittelchemie der Universität, von der Fa. Ilse Beetz, Kronach sowie von der Fa. Alfred Bernhardt, Mühlheim/Ruhr, durchgeführt.

Die optische Drehung wurde mit dem Kreispolarimeter $0,01^{\circ}$ (Rohr: 50 mm x 3,5 mm $\varnothing$) der Fa. Zeiss bestimmt, der

Brechungsindex mit dem Abbe Refraktometer des gleichen Herstellers.

Die UV-Spektren wurden mit dem registrierenden Zeiss-Spektralphotometer R P Q 20 A unter Verwendung von 1mm-Küvetten aufgenommen.

Die IR-Spektren wurden sowohl mit dem Perkin-Elmer Gittergerät 237 als auch mit dem Prismengerät 221 der gleichen Firma aufgenommen. Feste Substanzen kamen in KBr-Preßlingen, Flüssigkeiten als Film zwischen NaCl-Fenstern zur Messung.

Die KMR-Spektren sind mit den "Varian"-Geräten A 60 bzw. A 60 A aufgenommen, die Massenspektren zum einen mit dem Atlas CH4-Massenspektrometer, ausgerüstet mit Ofenschleuse T04 und Lichtpunktschreiber, zum anderen mit dem Atlas CH4-Gerät H T E 140^o unter Verwendung eines Tintenschreibers.

Alle verwendeten Kieselgelsorten wurden von der Fa. E. Merck, Darmstadt, bezogen.

Zur Chromatographie an Kieselgel

Die Herstellung von Kieselgel-Dünnschichtplatten 20 x 20 cm nach STAHL (45)

22 g Kieselgel GF₂₅₄ wurden mit 50 ml Wasser im Dünnschichtstreichgerät (Fa. Desaga, Heidelberg) angeschüttelt und die Suspension auf 5 Platten der angegebenen Größe ausgestrichen. Nach Abtrocknen der Schicht an der Luft wurden die Platten 20 Min. lang bei 105°C aktiviert.

Durchführung der dünnschichtchromatographischen (dc) Trennung nach STAHL (45)

Die zu trennende Fraktion wurde, wenn nötig, in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und mittels einer Pipette etwa 1,5 cm vom unteren Rand der Platte strichförmig, meist 1-2 cm breit, aufgetragen. Die Entwicklung der Platte wurde stets bei Kammersättigung vorgenommen. Nach Beendigung der Trennung und Abdunsten des Fließmittels wurden die Substanzflecke, wenn nötig, durch Ansprühen mit einem geeigneten Detektionsmittel oder durch Einstellen in eine Jodatmosphäre sichtbar gemacht.

Die Herstellung von präparativen Kieselgel-Schichtplatten 20 x 40 cm nach HALPAAP (46)

Eine homogene Suspension von 50 g Kieselgel PF₂₅₄ in 120 ml Wasser wurde auf die Glasplatte ausgegossen und gleichmäßig verteilt. Nach völligem Abtrocknen der Schicht wurden die Platten drei Stunden lang bei 105°C aktiviert. Die Schichtdicke betrug etwa 2 mm.

Durchführung präparativer schichtchromatographischer Trennungen nach HALPAAP (46)

Die zu trennende Fraktion wurde in einem geeigneten organischen Lösungsmittel klar gelöst und die Lösung mittels einer Pipette etwa 2 cm vom unteren Rand der Schichtplatte strichförmig aufgetragen. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurden die Platten in einer Chromatographie-Kammer entwickelt. Zur Verbesserung der Trennung wurde die Entwicklung mehrmals wiederholt, wobei ich das Fließmittel jeweils vor der erneuten Trennung abdunsten ließ.

Die Gewinnung der getrennten Substanzen

Die getrennten Substanzzonen wurden, wenn sie keine Eigenfarbe besaßen, im UV-Licht bei 254 m μ markiert, gesammelt, das Kieselgel im Mörser homogen verrieben, in einem geeigneten Lösungsmittel aufgenommen und die Suspension über einem Büchnertrichter abgesaugt. Suspendieren und Absaugen wurde 2-3mal wiederholt, um die Substanz quantitativ vom Kieselgel zu eluieren. Die erhaltene Substanzlösung wurde am Rotationsverdampfer auf ein kleines Volumen eingengt und mittels einer Glassinterfritte vom restlichen Kieselgel befreit.

V o r v e r s u c h e

Vorversuch zur Tieftemperatur-Vakuumdestillation

100 g Pilzmaterial wurden in einen 2-Liter-Rundkolben übergeführt und - in möglichst gleichmäßiger Schichtdicke auf der Kolbenwand verteilt - eingefroren. Hinter den Kolben wurden 3 Kältefallen geschaltet, die dem Kolben nächste wurde mit CO_2 -Aceton-Gemisch, die beiden anderen mit flüssiger Luft gekühlt.

Nach 25 Stunden bei einem Vakuum < 1 Torr war das Pilzmaterial getrocknet.

Nachweis von Carbonylverbindungen in der Gasphase über dem Pilz

In eine Petrischale von 10 cm $\varnothing$ wurde die Gleba von zwei Hüten gebracht und auf der Fläche verteilt. Auf die Innenseite des Deckels wurden nun Tropfen von 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagens (47) so aufgetupft, daß sie möglichst nicht miteinander in Berührung kamen. Hierauf wurde die Petrischale geschlossen. Nach 48 Stunden wurden die Kristalle abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

T i e f t e m p e r a t u r - V a k u u m d e s t i l l a = t i o n d e s P i l z m a t e r i a l s

7,5 kg Pilzmaterial wurde in 16 Ansätzen von durchschnittlich 470 g im tiefgefrorenen Zustand in 1-2 cm dicke Scheiben von etwa 12 cm Kantenlänge geschnitten. Diese Scheiben wurden an die Innenwand eines 10-Liter-Quickfit-Planschliffkolbens angelegt und der Kolben mit Hilfe eines Kryostaten gekühlt. Hinter den Kolben wurden 3 Kältefallen geschaltet, davon die dem Kolben nächste Falle mit einem vergrößerten Volumen von 500 ml. Die Kältefallen wurden mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Die Destillationen wurden bei Ölpumpenvakuum < 1 Torr durchgeführt und dauerten im Durchschnitt 24 Stunden. Die Belüftung der Apparatur geschah mit von Carbonylverbindungen befreiter Luft.

Gewinnung der 2,4-Dinitrophenylhydrazone

Die Kondensate wurden sofort nach Öffnen der Apparatur noch in gefrorenem Zustand mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagens (47) in ml-Portionen versetzt. Nach vervollständigter Fällung wurden die 2,4-Dinitrophenylhydrazone nach mindestens 24stündigem Stehen abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Präparativ-schichtchromatographische Trennung der 2,4-Dinitrophenylhydrazone

Aus 7,5 kg Pilzmaterial wurde 1 g 2,4-Dinitrophenylhydra-zongemisch erhalten. Dieses wurde in Äthylacetat gelöst*)

*) Beim Einengen der Äthylacetatlösung bildete sich ein kristalliner Niederschlag von überschüssigem freiem Fällungsreagens. Überschüssiges Fällungsreagens, das in Rohfällungen dieser Art stets vorhanden ist und sowohl als freies 2,4-Dinitrophenylhydrazin als auch als 2,4-Dinitrophenylhydraziniumperchlorat vorliegen kann, stört bei der chromatographischen Trennung der entsprechenden Hydrazone nicht. Aufgrund der Polarität der funktionellen Gruppen bleibt es an Kieselgel bei den verwendeten Fließmitteln stets am Startpunkt.

und nach der angegebenen Vorschrift an Kieselgel PF₂₅₄ mit dem Fließmittelsystem Tetrachlorkohlenstoff/n-Hexan/Äthylacetat 100:20:5 (v/v) aufgetrennt. Dazu wurden 40 Platten (20 x 40 cm) benötigt. Die Ablösung der Substanzen vom Kieselgel geschah mittels Äthylacetat.

2,4-Dinitrophenylhydrazin-Fällungsreagens nach (47)

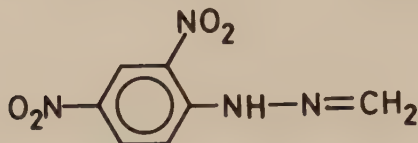
2,4 g fein gepulvertes 2,4-Dinitrophenylhydrazin wurden ohne Anwendung von Wärme in 100 ml 30%iger Perchlorsäure gelöst. Nach 24 Stunden wurde filtriert.

Darstellung von 2,4-Dinitrophenylhydrazonen, die als Vergleichssubstanzen benötigt wurden (47)

5 ml der Reagenslösung wurden mit 10 ml Wasser gemischt und etwas weniger als die äquivalente Menge der Carbonylverbindung, in 3 ml Äthanol gelöst, zugegeben. Nach kurzem Erhitzen des Reaktionsgemisches im Wasserbad ließ ich abkühlen, saugte das ausgefallene 2,4-Dinitrophenylhydrazon ab und kristallisierte aus Äthanol (aldehydfrei) oder Äthylacetat um.

S u b s t a n z 4

(identisch mit Formaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon)



Gelbe Nadeln (aus verd. aldehydfreiem Äthanol)

Schmp.: 164-166°C

Schmp.: n.Lit. 167°C (40)

C₇H₆N₄O₄ (210,16)

Analyse: 5,518 mg Substanz: 8,099 mg CO₂, 1,452 mg H₂O

2,684 mg Substanz: 0,651 ml N₂ (27,6°C; 731,5 Torr)

Ber.: 40,00% C 2,88% H 26,66% N

Gef.: 40,05% C 2,95% H 26,51% N

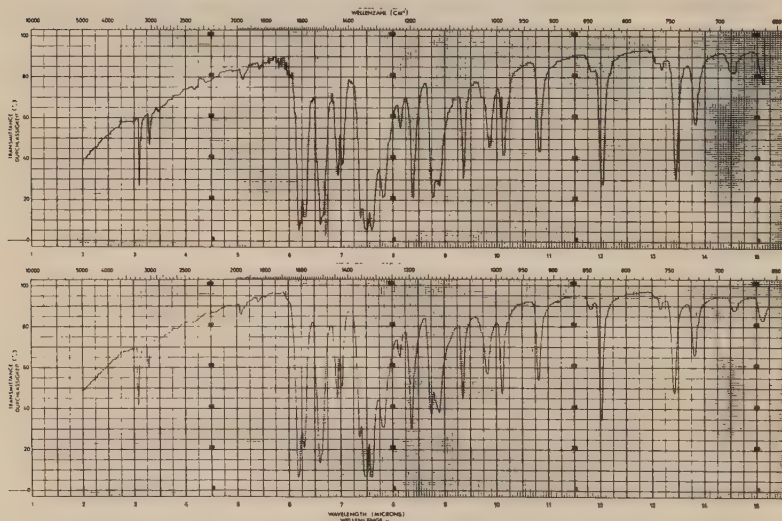


Abb. 18

IR-Spektren (KBr-Preßtechnik)

oben: Substanz 4

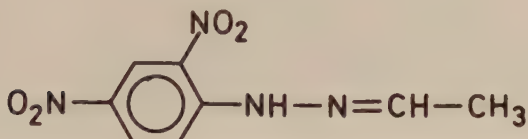
unten: Formaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon

Nachweis des freien Formaldehyds (25)

1 Tropfen der formaldehydhaltigen Lösung wurde in einem Reagensglas mit 2 ml 72%iger Schwefelsäure und hierauf mit etwas fester Chromotropsäure versetzt. Ich erwärmte das Gemisch 10 Min. lang im Wasserbad bei 60°C. Eine violett-rosa Färbung bedeutet positiven Ausfall der Reaktion.

S u b s t a n z 3

(identisch mit Acetaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon)



Rotbraune Kristalle (aus aldehydfreiem Äthanol)

Schmp.: 165-166°C

Schmp.: n.Lit. 168°C (40)

$C_8H_8N_4O_4$ (224,18)

Analyse: 5,749 mg Substanz: 8,983 mg CO_2 , 1,866 mg H_2O

2,918 mg Substanz: 0,659 ml N_2 , (27,8°C, 731,5 Torr)

Ber.: 42,86% C 3,60% H 24,99% N

Gef.: 42,64% C 3,63% H 24,67% N

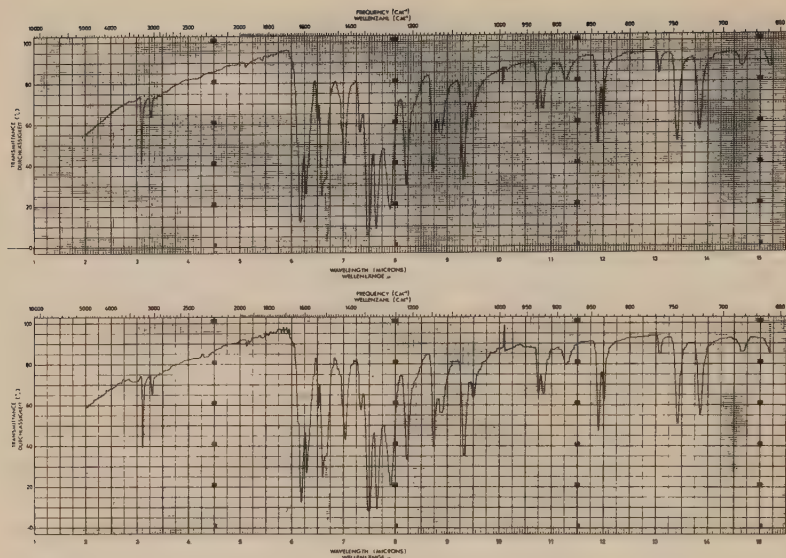
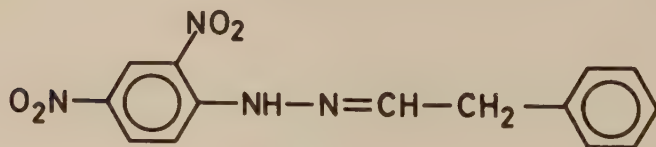


Abb. 19 IR-Spektren (KBr-Preßtechnik)
oben: Substanz 3
unten: Acetaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon

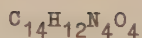
S u b s t a n z 2
(identisch mit Phenylacetaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon)



Gelbe Kristalle aus aldehydfreiem Äthanol

Schmp.: 119 -121°C

Schmp.: n.Lit. 121°C (47)



Analyse: 4,494 mg Substanz: 9,220 mg CO_2 , 1,610 mg H_2O
 2,740 mg Substanz: 0,464 ccm N (25°C , 728 mm)

Ber.: 56,00% C 4,03% H 18,66% N

Gef.: 55,99% C 4,01% H 18,58% N

Molekulargewicht: 300,28

Gef.: 300 (aus dem Massenspektrum)

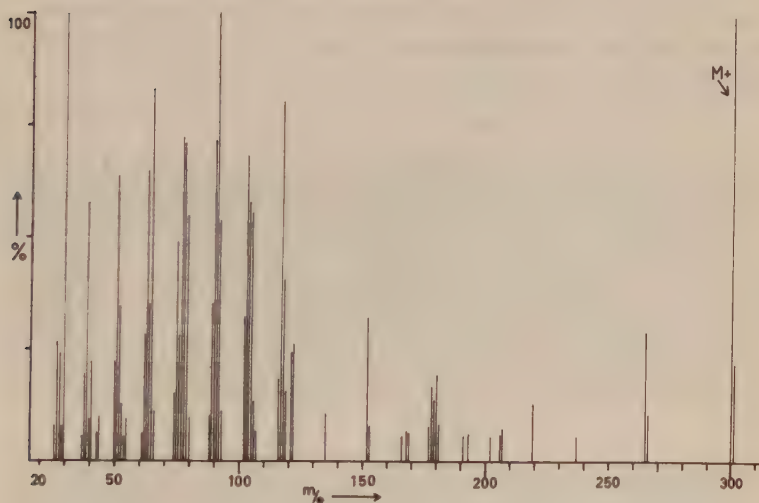


Abb. 20

Massenspektrum von Substanz 2

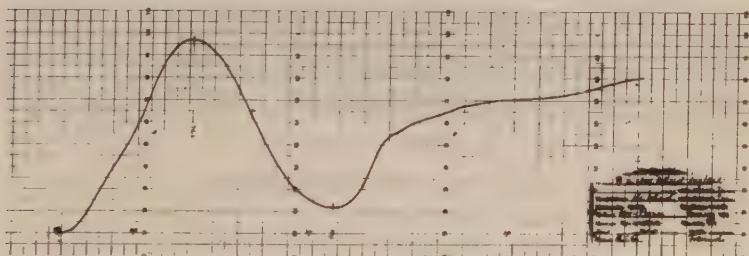


Abb. 21 UV-Spektrum von Substanz 2 in absol. Äthanol
 (Wirksame Schichtdicke 2 mm, Bereich 500-230 nm)
 λ_{max} : 356 nm

UV-Spektrum:

Gef.: $\lambda_{\max} = 354 \text{ nm}$ (Chloroform)
 $\lambda_{\max} = 356 \text{ nm}$ (Abs. Äthanol) (Abb. 21)

Nach Lit. Angabe:

$\lambda_{\max} = 353 \text{ nm}$ (Chloroform) (48)

Darstellung der Vergleichssubstanz

1 g Phenylacetaldehyddimethylacetal wurde 20 Min. lang mit verd. Salzsäure unter Rückfluß erhitzt, der Aldehyd ausgeäthert und nach der angegebenen Vorschrift zum 2,4-Dinitrophenylhydrazon umgesetzt.

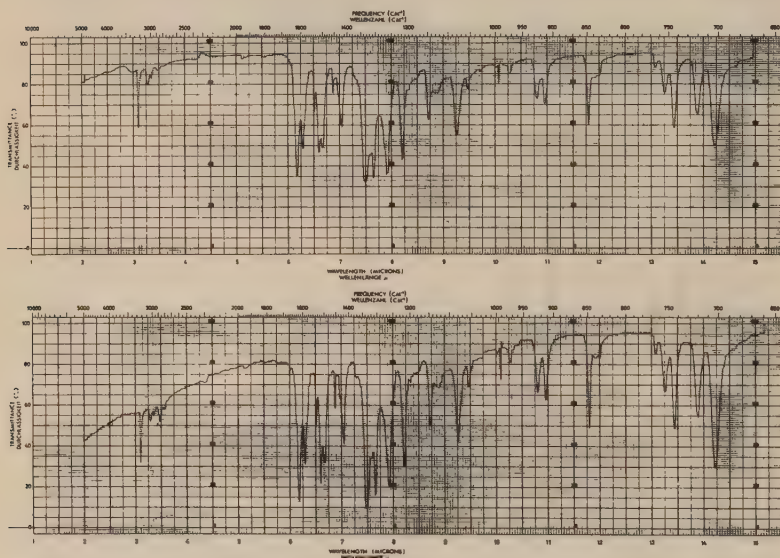


Abb. 22

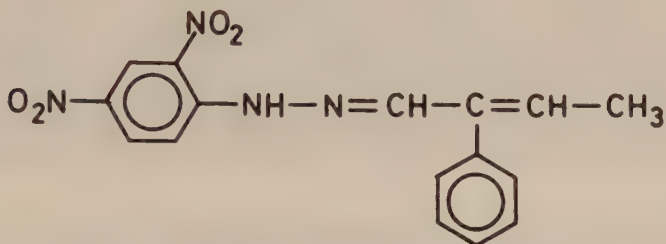
IR-Spektren (KBr-PreStechnik)

oben: Substanz 2

unten: Phenylacetaldehyd-2,4-dinitrophenyl-
hydrazon

S u b s t a n z 1

(identisch mit α -Phenylcrotonaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon)



Rote Kristalle (aus aldehydfreiem Äthanol)

Schmp.: $199 - 202^\circ\text{C}$

Schmp. nach Lit.: nicht gefunden

$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4$

Molekulargewicht: 326,32

gef.: (aus dem Massenspektrum) 326

Analyse: 4,080 mg Substanz: 8,78 mg CO_2 , 1,73 mg H_2O

4,004 mg Substanz: 0,606 ml N_2 (29°C , 752 mm)

Ber.: 58,89% C 4,32% H 17,17% N

Gef.: 58,73% C 4,75% H 16,94% N

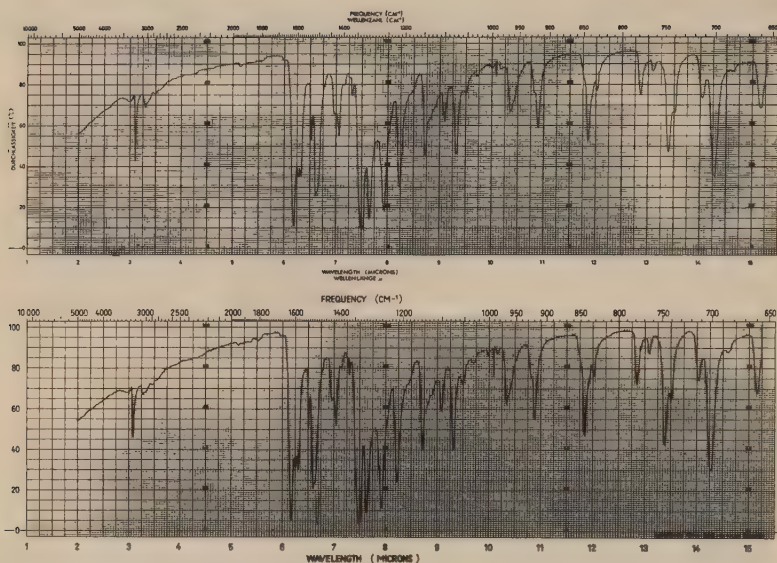


Abb. 23

IR-Spektren (KBr-Preßtechnik)

oben: Substanz 1

unten: α -Phenylcrotonaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon

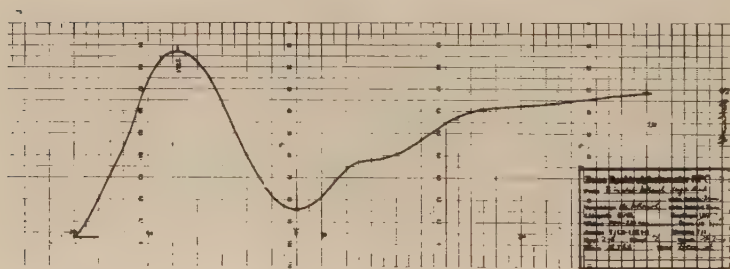


Abb. 24

UV-Spektrum von Substanz 1 in absol. Äthanol

(Wirksame Schichtdicke 2 mm, Bereich 500-230 nm)

λ_{max} : 376 nm

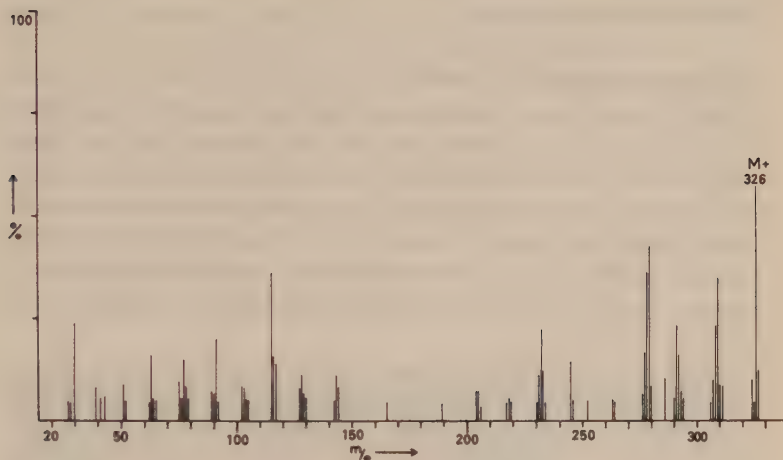


Abb. 25

Massenspektrum von Substanz 1

Isolierung des freien Aldehyds

4,5 kg Pilzmaterial wurden in Anteilen von ca. 400 g mit Kieselgel 0,05-0,2 mm zu einem trockenen Pulver verrieben und mit Äther unter Rückfluß erschöpfend extrahiert. Die Extraktlösungen wurden am Rotationsverdampfer bei 30°C nicht überschreitender Badtemperatur vorsichtig eingeeengt, ausgefallene Sterine und Fette abfiltriert und der Extrakt der präparativen Schichtchromatographie mit dem Fließmittelsystem Cyclohexan/Chloroform/Äthylacetat 70:20:5 (v/v) unterworfen. Sorbens: Kieselgel PF₂₅₄.

Die Trennung wurde, da Auskristallisieren nicht möglich war, so oft wiederholt, bis die erhaltene Substanzzone chromatographisch einheitlich war.

Die Identität der Substanz wurde durch Umsetzen einer kleinen Menge des isolierten Produktes zum 2,4-Dinitrophenylhydrazon und dünnschichtchromatographischen Vergleich mit Substanz 1 nachgewiesen.

Es wurden größenordnungsmäßig 10 - 15 mg der freien Carbo-
nylverbindung erhalten.

Kaliumpermanganatabbau nach (27)

5 mg des isolierten Aldehyds wurden in einem Kölbchen mit
1 ml Aceton versetzt. Nach Zugabe von 1/6 von 100 mg fein
gepulverten Kaliumpermanganats sowie eines Siedestäbchens
wurde 15 Min. lang im auf 65°C thermostatierten Wasserbad
unter Rückfluß erhitzt. Hierauf wurde das Kölbchen in Eis-
wasser abgekühlt, der Kühler entfernt und ein weiteres
Sechstel des vorbereiteten Kaliumpermanganats zugegeben.

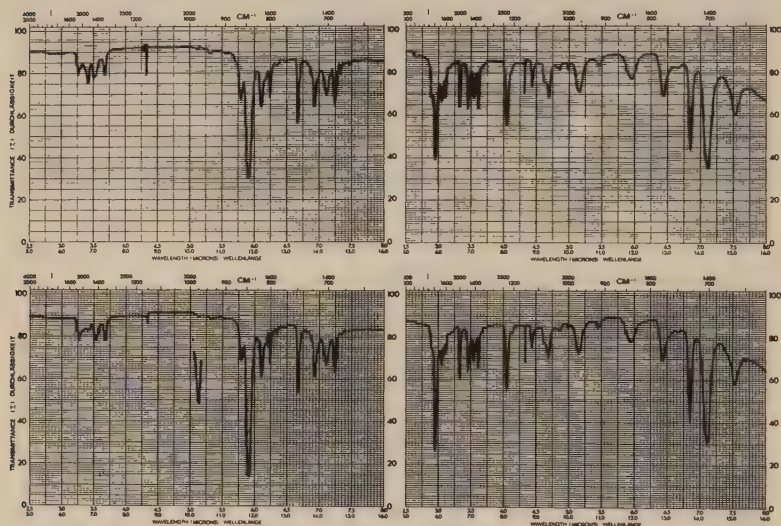


Abb. 26

IR-Spektren (Filmtechnik)

oben: α-Phenylcrotonaldehyd, isoliert

unten: α-Phenylcrotonaldehyd, synthetisiert

In dieser Weise wurden in Abständen von ca. 15 Min. insge-
samt 100 mg KMnO_4 zugefügt, anschließend noch 5 Std. weiter
unter Rückfluß erhitzt. Hierauf wurde das Aceton am Rota-
tionsverdampfer vorsichtig abgezogen und der Kolbeninhalt

mit 0,5 ml verdünnter Ameisensäure (Gehalt: 1,2 mMol/ml) versetzt. Sodann wurden 2 x 0,5 ml 3,6 n Kaliumhydrogencarbonatlösung zugegeben und nach guter Durchmischung die Mangandioxidsuspension auf 2 Zentrifugengläser verteilt. Nach Zentrifugieren wurde die überstehende Lösung abpipettiert und die Extraktion des Sedimentes mit KHCO_3 -Lösung 2mal in gleicher Weise wiederholt. Die vereinigten Kaliumbicarbonatlösungen wurden in einem Scheidetrichter mit verd. Schwefelsäure angesäuert und 4mal mit je 1 ml Chloroform ausgeschüttelt. Der Rückstand der Chloroformlösung wurde in Äther aufgenommen und dc analysiert.

Synthese von α -Phenylcrotonaldehyd nach (28)

22 g Phenylacetaldehyd, 9,3 g frisch destillierter Acetaldehyd, 18,5 g Wasser, 18,5 g Alkohol und 9,3 g krist. Natriumacetat wurden 24 Std. lang bei einer Ölbadtemperatur von 110-125° C unter Rückfluß erhitzt.

Anschließend wurden die beiden Schichten getrennt, die wässrigen Anteile 2mal ausgeäthert, die organischen Phasen vereinigt, eingeengt, über CaCl_2 getrocknet und nach Abziehen des Äthers im Vakuum destilliert.

Kp₁₄: 120°C

Lit. Angabe (28): Kp₁₅: 119°C

W a s s e r d a m p f d e s t i l l a t i o n d e s P i l z = m a t e r i a l s

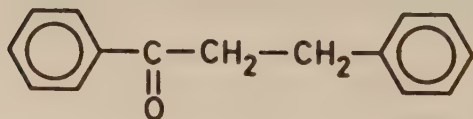
8 kg Pilzmaterial wurden mit Kieselgel 0,05-0,2 mm in Anteilen von 400 g zu einem trockenen Pulver verrieben und mit Äther unter Rückfluß erschöpfend extrahiert. Die ätherischen Lösungen wurden am Rotationsverdampfer bei 30°C nicht überschreitender Badtemperatur vorsichtig vom Lösungsmittel weitgehend befreit und der Wasserdampfdestillation unterworfen.

Die erhaltenen 40 Liter wäßrigen Destillates wurden mit Äther bis zur Geruchsfreiheit perforiert und die vereinigten Perforate nach Trocknen über Natriumsulfat in gleicher Weise wie oben schonend konzentriert.

Für die präparative Schichtchromatographie an Kieselgel PF₂₅₄ wurden 35 Platten (20 x 40 cm) benötigt. Mit dem Fließmittelsystem Cyclohexan/Chloroform/Äthylacetat 70:20:5 (v/v) wurde 3mal entwickelt, die getrennten Zonen im UV-Licht markiert und wie in der allgemeinen Vorschrift angegeben weiterbehandelt.

S u b s t a n z W₂

(identisch mit ω -Benzylacetophenon = Dihydrochalcon)



Farblose Kristallblättchen

Schmp.: 68°-70°C (nicht umkristallisiert)

Schmp.: n. Lit. 72°-73°C (30)

$C_{15}H_{14}O$

M.G.: 210,28

M.G. gef.: 210 (berechnet aus dem Massenspektrum des 2,4-Dinitrophenylhydrazons)

UV-Spektrum des 2,4-Dinitrophenylhydrazons:

Gef.: $\lambda_{\max} = 378 \text{ nm}$ (abs. Äthanol)

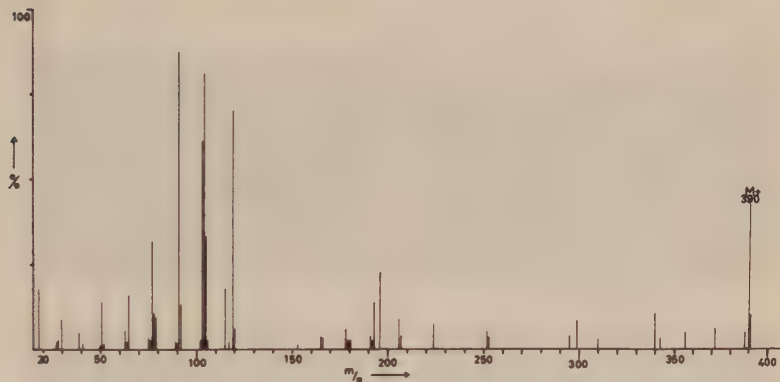


Abb. 27 Massenspektrum des 2,4-Dinitrophenylhydrazons von Substanz W₂

Gewinnung von W₂ aus dem Wasserdampfdestillat

Die W₂ entsprechende, chromatographisch noch nicht reine Fraktion wurde an 3 Platten Kieselgel PF₂₅₄ mit dem Laufmittel Benzol/Petroläther (35°C) 3/1 (v/v) unter den üblichen Bedingungen rechromatographiert.

Darstellung von W-Benzylacetophenon (30)

0,12 g Platindioxid wurden zusammen mit 30 ml Äthylacetat in eine Hydrierapparatur eingebracht und nach Reduktion des Katalysators 9,5 g frisch aus Äthanol umkristallisiertes

Benzalacetophenon in 40 ml Äthylacetat zugefügt. Nach Aufnahme der berechneten Menge Wasserstoff für eine Doppelbindung wurde die Reaktion beendet, der Katalysator entfernt und nach Abziehen des Lösungsmittels i.Vak. der Rückstand aus Äthanol umkristallisiert.

Farblose Kristalle, Schmp. 70° - 71°C

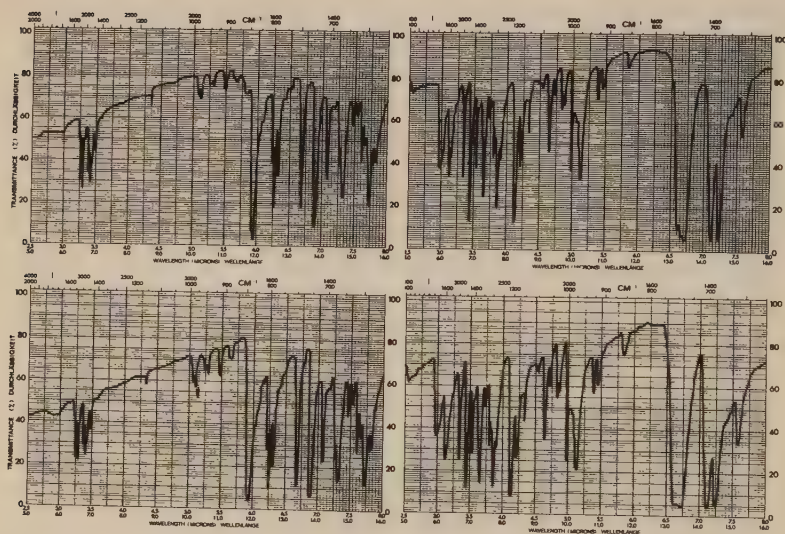


Abb. 28

IR-Spektren (KBr-Preßtechnik)

oben: Substanz W_2

unten: Dihydrochalcon

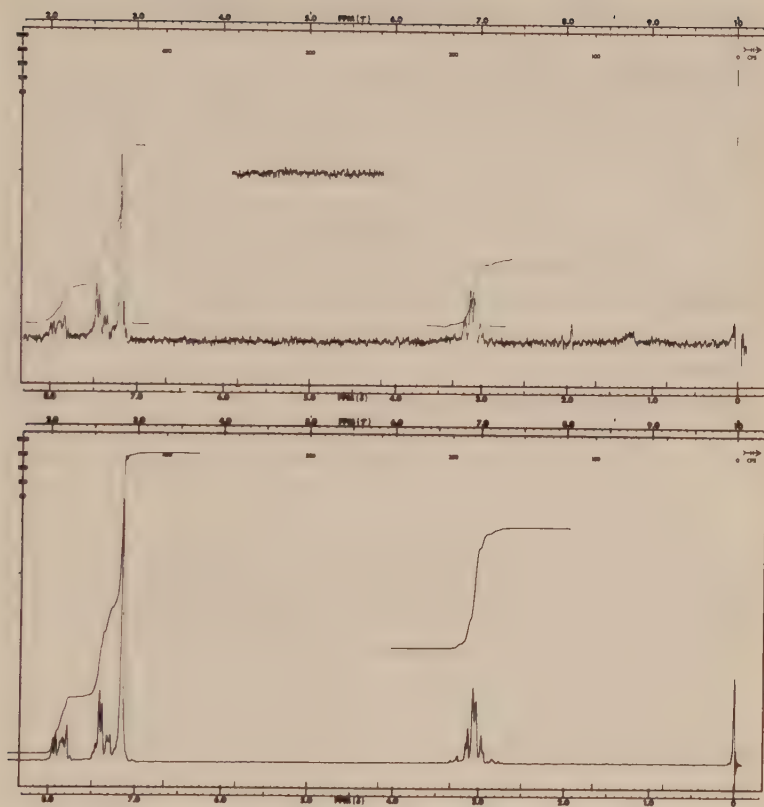


Abb. 29

KMR-Spektren (aufgenommen in CCl_4)
Innerer Standard: Tetramethylsilan;
oben: Substanz W_2
unten: Dihydrochalcon (Synthese)

Bearbeitung von Zone 7 des Wasserdampfdestillates

Veresterung mit Methanol nach (33)

0,15 g des Carbonsäuregemisches wurden in einem Kölbchen mit 3 ml Bortrifluorid-Methanol-Reagens versetzt und die Lösung auf dem siedenden Wasserbad 2 Min. lang unter Rückfluß erhitzt. Hierauf überführte ich das Reaktionsgemisch unter Nachspülen mit 20 ml Wasser in einen 100-ml-Scheidetrichter und schüttelte 3mal mit je 3 ml Chloroform aus. Die vereinigten Chloroformphasen wurden nach Trocknen mit wenig Natriumsulfat am Rotationsverdampfer vorsichtig eingeeengt.

Bortrifluorid-Methanol-Reagens:

Bortrifluoridätherat "Fluka"	5 ml
Methanol	20 ml

Darstellung der Carbonsäurehydroxamate nach (27)

Das Reagens wurde aus folgenden Lösungen hergestellt:

Lösung A: 1 n Hydroxylaminhydrochlorid in Methanol

Lösung B: 1 n KOH in Methanol

1 Vol. A wurde mit 2 Vol. B gemischt und vom ausgefallenen KCl abgossen. Zu einem mmol Ester gab ich 3 ml Reagens und hielt 30 Min. bei 25°C. Hierauf wurde mit einem Gemisch von Äther und Eisessig (3:1) neutralisiert, die Lösung am Rotationsverdampfer eingeeengt und chromatographiert.

Herstellung der Cellulose-Dünnschichtplatten 20 x 20 cm

Eine Mischung von 15 g Cellulosepulver MN 300 (Hersteller: Macherey & Nagel, Düren) und 90 ml Wasser wurden mit einem elektrischen Mixgerät homogenisiert und mit einem Streichgerät auf 5 Platten der angegebenen Größe ausgestrichen. Nach Abtrocknen an der Luft wurden die Platten 20 Min. lang bei 95°C aktiviert.

Herstellung präparativer Celluloseschichtplatten 20 x 40 cm

8 g Cellulose wurden mit 60 ml Wasser 3 Min. lang mit einem "Ultra-Turrax"-Mixer homogenisiert und die Suspension auf eine Glasplatte ausgegossen. Die Platten wurden an der Luft trocknen gelassen, hierauf 1 Std. lang bei 95°C aktiviert.

Gewinnung des Phenyllessigsäurehydroxamates aus Zone 7

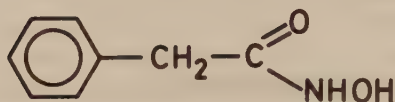
0,5 g des aus Zone 7 erhaltenen Substanzgemisches wurden nach Veresterung und Umsetzung mit Hydroxylamin (siehe Vorschriften) der präparativen Schichtchromatographie an Cellulose unterworfen. Mit dem Fließmittelsystem Amylalkohol/Eisessig/Wasser 4:1:5 (v/v) (34) (Oberphase) wurde einmal bis zum Plattenrand entwickelt. Für die Trennung wurden 11 Platten (20 x 40 cm) benötigt, die nach Abtrocknen des Fließmittels auf einem jeweils 1 cm breiten Randstreifen der Schicht mit FeCl_3 -Sprühreagens^{*)} besprüht wurden. Anhand der Anfärbungen wurde die dem R_f -Wert 0,8 entsprechende, nicht besprühte Hydroxamatzone markiert, die Cellulose gesammelt, mit Äthanol und Äthylacetat eluiert und die erhaltene Lösung eingeengt. Zur Entfernung von Wasser und gelöster Cellulose wurde der Rückstand in Benzol aufgenommen und die Lösung über eine G_3 -Sinterfritte gesaugt. Nach Abziehen des Benzols wurde aus Äthylacetat auskristallisiert.

*) FeCl_3 -Sprühreagens nach (27)

2%ige Lösung von FeCl_3 in Äthanol/Butanol 4:1

Z o n e 7 des Wasserdampfdestillates

Phenyllessigsäurehydroxamat



Schwach rosa gefärbte Kristalle aus Äthylacetat.

Schmp.: 140-142°C

Schmp. n. Lit.: 139 -141°C (37)

M.G. Ber.: 151,17

Gef.: 135 (aus dem Massenspektrum) (Abb. 33)

Differenz: 16

Vergleichssubstanz: Phenyllessigsäurehydroxamat

M.G. Ber.: 151,17

Gef.: 135 (aus dem Massenspektrum) (Abb. 33)

Differenz: 16

Analyse: 3,066 mg Substanz: 7,155 mg CO₂, 1,700 mg H₂O
2,138 mg Substanz: 0,189 ccm N (28°C, 721 mm)

Ber.: 63,56% C 6,00% H 9,27% N

Gef.: 63,70% C 6,21% H 9,51% N

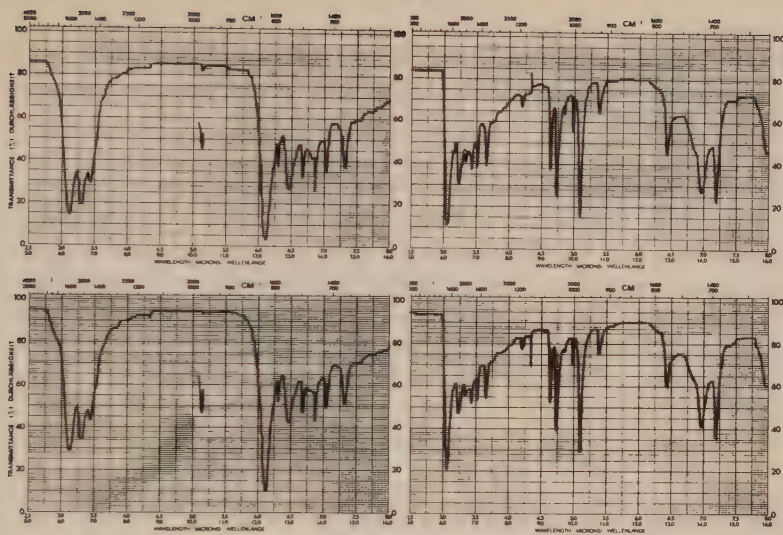


Abb. 30

IR-Spektren (KBr-Preßtechnik)
oben: Phenyllessigsäurehydroxamat aus Zone 7
unten: " (Synthese)

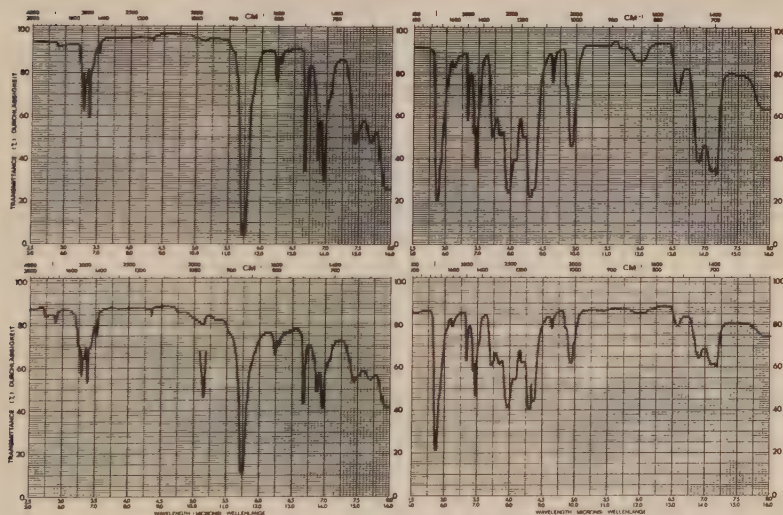


Abb. 31

IR-Spektren (Film auf NaCl-Fenstern)
oben: Phenyllessigsäuremethylester aus Zone 7
unten: " (Synthese)

Darstellung von authentischem Phenyllessigsäurehydroxamat

0,3 g Phenyllessigsäure wurden nach den angegebenen Vorschriften mit Methanol verestert und zur Hydroxamsäure umgesetzt. Nach Neutralisation trennte ich das Reaktionsgemisch auf 8 Cellulose-Schichtplatten (20 x 40 cm) mit der Oberphase des Fließmittels Amylalkohol/Eisessig/Wasser 4:1:5 (v/v) durch Entwicklung bis zum Plattenrand. Nach Besprühen eines schmalen Randstreifens mit FeCl_3 -Sprühreagens wurde die Hydroxamatzone markiert, die nicht besprühten Anteile wurden gesammelt, eluiert und die Lösung von gelöster Cellulose befreit. Der Rückstand wurde aus Äthylacetat umkristallisiert. Schmp.: $141-142^\circ\text{C}$.

Präparative Gaschromatographie der Carbonsäureester der Zone 7

Gerät: Wilkens Autoprep A 700

Säule: 30% SE 30 ("Silicon Gum Rubber Methyl")

auf Chromosorb W

Länge: 6 m, $\varnothing$ 6 mm

Trägergas: 200 ml Helium pro Min.

Temperatur: 200°C (Säule)

Retentionszeit des isolierten Phenyllessigsäuremethylesters: 10 Min.

Brechungsindex des isolierten Phenyllessigsäuremethylesters:

Gef.: $n_D^{23,5} = 1,5052$

Nach Lit. Angaben: $n_D^{16} = 1,509$ (35a)

Gaschromatographie der freien Carbonsäuren der Zone 7 (Abb.32)

Gerät: Perkin Elmer Fraktometer 116 E, mit Wärmeleitfähigkeitsdetektor

Säule: Standardsäule BA, 2 m lang

(Sebacinsäure und Sebacinsäureester)

Trägergas: Helium, 1,1 atü, 3 Einheiten

Temperatur: 175°C (Säule)

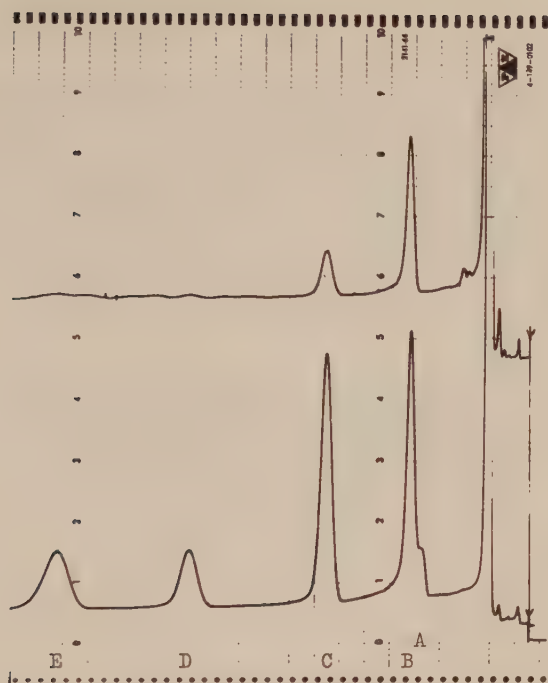


Abb. 32

Gaschromatographie der freien Carbonsäuren
der Zone 7 (oben);
das untere Chromatogramm zeigt die zum Vergleich
eingespritzten Carbonsäuren:

- A: Ameisensäure
- B: Essigsäure
- C: Propionsäure
- D: Buttersäure
- E: iso-Valeriansäure

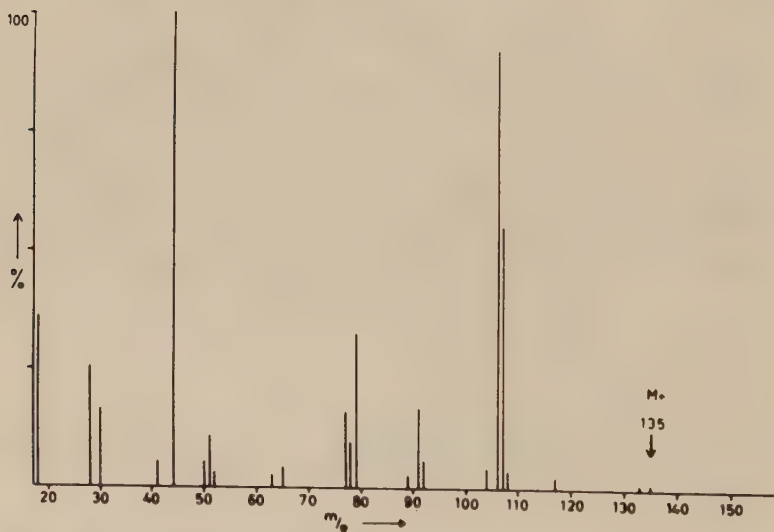
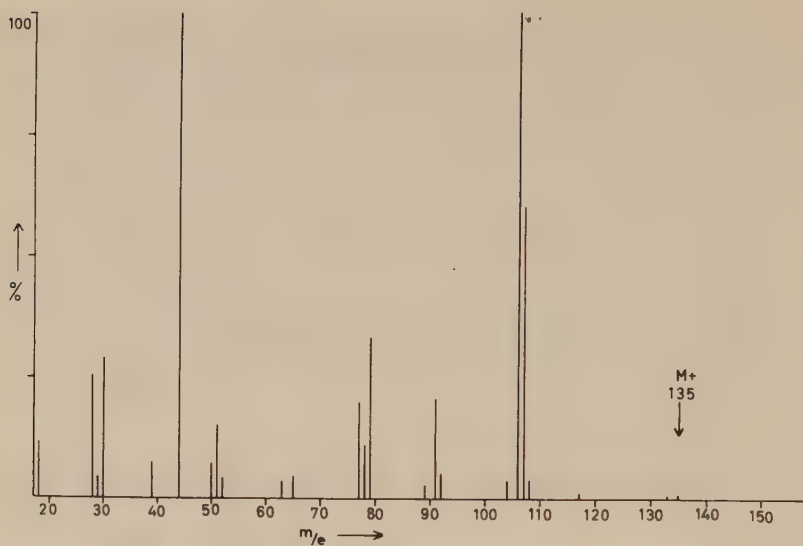


Abb. 33

Massenspektren:

oben: Phenylacessigsäurehydroxamat aus Zone 7

unten: " (Synthese)

Gewinnung der flüchtigen Schwefelverbindungen

2,2 kg Pilzmaterial wurden in Anteilen unter Zusatz eines Antischaummittels im Starmix homogenisiert und der Wasserdampfdestillation unterworfen. Dem Auffangkolben für das Destillat waren 3 Waschflaschen mit frischer 40%iger Kalilauge (24) nachgeschaltet. Während der Destillation wurde ein leichter Stickstoffstrom*) durch die Apparatur geleitet. Pro kg Pilzmaterial wurden 10 Liter wäßriges Destillat gewonnen.

Umsetzung der flüchtigen Schwefelverbindungen mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol und Isolierung der Derivate

In einem 50-ml-Dreihalskolben mit Magnetrührer wurden - berechnet auf die zu neutralisierende 40%ige Kalilauge - überschüssige 20%ige Schwefelsäure vorgelegt. Unter Rühren ließ ich langsam die flüchtigen Schwefelverbindungen enthaltende Kalilauge zutropfen. Diese wurden mittels eines leichten Stickstoffstromes*) in eine Mischung von 20 ml Äthanol, 0,4 g 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol und 2 ml Pyridin (41) übergeführt. Nachdem die Schwefelverbindungen vollständig übergetrieben worden waren, wurde der Kolben mit dem 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol-Reaktionsgemisch auf dem siedenden Wasserbad 5 Minuten lang am Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen zog ich das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer ab, nahm in wenig Äthylacetat/Äthanol-Gemisch auf und unterwarf die Lösung der präparativen Schichtchromatographie an Kieselgel PF₂₅₄. Das Reaktionsgemisch wurde an 6 Platten (20 x 40 cm) mit dem Fließmittel Benzol/Petroläther (35°) 3:1 (v/v) aufgetrennt, die den 2,4-Dinitrophenylsulfiden zugeordneten Zonen markiert, gesammelt und mittels Äthylacetat und Äthanol eluiert.

*) Stickstoff "nachgereinigt"

Blindversuch mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzöl-Reagens

Reagens: (41) 10 ml Äthanol
0,2 g 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol
1 ml Pyridin

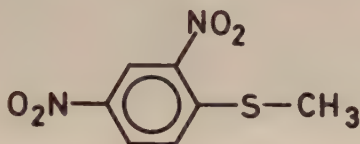
Durch diese Lösung wurde 2 Stunden lang unter dem oben beschriebenen Bedingungen ein Stickstoffstrom^{*)} geleitet.

Hierauf wurde, wie oben beschrieben, weiterverfahren und Ansatz und Blindansatz dünn-schichtchromatographisch verglichen. Fließmittel Benzol/Petroläther (35°) 3:1 (v/v) (Abb. 16)

^{*)} Stickstoff "nachgereinigt"

S u b s t a n z 8 - D

(identisch mit Methyl-2,4-dinitrophenyl-sulfid)



Goldgelbe Kristalle aus verdünntem Äthanol.

Qualitative Prüfung auf Schwefel: positiv

Schmp.: 128-129°C

Schmp.: n. Lit.: 127°C (41)

$C_7H_6N_2O_4S$

M.G.: 214,20

Analyse der Vergleichssubstanz: (das isolierte Produkt
reichte zur Analyse nicht aus):

4,233 mg Substanz: 6,065 mg CO_2 , 1,140 mg H_2O

4,106 mg Substanz: 0,485 ml N_2 (27,1°C, 724 Torr)

5,720 mg Substanz: 6,250 mg $BaSO_4$

Ber.: 39,25% C 2,83% H 13,08% N 14,97% S

Gef.: 39,10% C 3,01% H 12,80% N 15,00% S

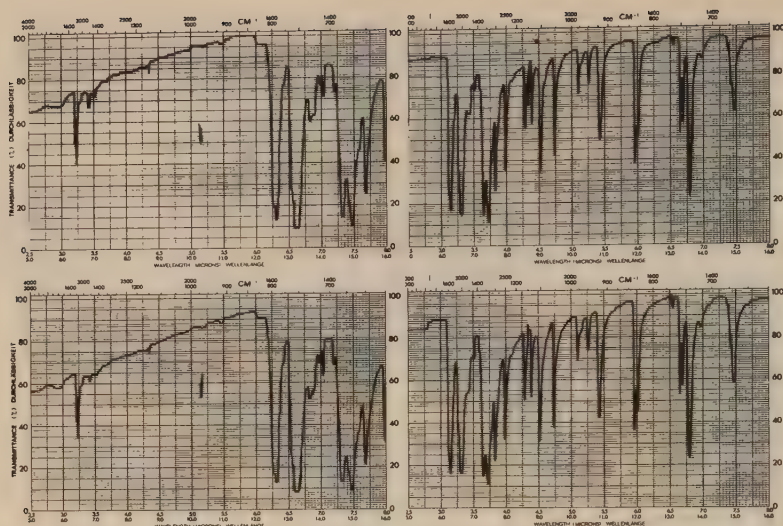


Abb. 34 IR-Spektren (KBr-PreStechnik)
oben: isoliertes Derivat des Methylmercaptans
unten: Methyl-2,4-dinitrophenyl-sulfid

Darstellung von authentischem Methyl-2,4-dinitrophenyl-sulfid (41)

Der Reagenslösung, bestehend aus

10 ml Äthanol

0,4 g 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol

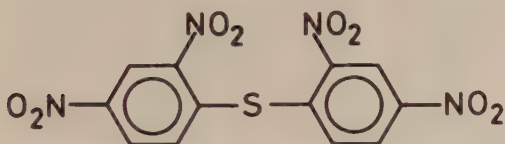
1 ml Pyridin

wurden etwa 0,1 g Methylmercaptan zugefügt. Nach Umschwenken wurde das Reaktionsgemisch 5 Min. auf dem heißen Wasserbad zum Sieden erhitzt und mit heißem Wasser bis zu eben einsetzenden Trübung versetzt. Nach dem Erkalten wurden die ausgefallenen Kristalle abgesaugt und aus verd. Äthanol umkristallisiert.

Schmp.: 127,5-128,5°C

S u b s t a n z 9 - D

(identisch mit Bis-(2,4-dinitrophenyl)-sulfid)



Gelbe Kristalle aus Äthanol.

Qualitative Prüfung auf Schwefel: positiv.

Schmp.: 198-199°C

Schmp. n. Lit.: 195°C (49)

$C_{12}H_6N_4O_8S$

M.G.: 366,27 Gef.: 366 (aus dem Massenspektrum)

Analyse: 4,268 mg Substanz: 6,130 mg CO_2 , 0,627 mg H_2O

2,227 mg Substanz: 0,302 ml N_2 (729,5 Torr, 26,1°C)

7,656 mg Substanz: 5,110 mg $BaSO_4$

Ber.: 39,35% C 1,66% H 15,30% N 8,76% S

Gef.: 39,20% C 1,64% H 14,86% N 9,16% S

Darstellung von authentischem Bis-(2,4-dinitrophenyl)-sulfid

Reagens: 10 ml Äthanol

0,4 g 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol

1 ml Pyridin

In die Reagenslösung wurde Schwefelwasserstoffgas bis zur Sättigung eingeleitet, hierauf das Reaktionsgemisch 5 Min. auf dem heißen Wasserbad zum Sieden am Rückfluß erhitzt. Die beim Erkalten ausgefallenen Kristalle wurden abgesaugt und aus heißem Äthanol umkristallisiert.
Schmelzpunkt: 198-199°C.

Analyse: 2,898 mg Substanz: 4,199 mg CO₂, 0,476 mg H₂O
2,592 mg Substanz: 0,351 ccm N (25°C, 724 mm)

Ber.:	39,35% C	1,66% H	15,30% N	8,76% S
Gef.:	39,54% C	1,83% H	14,78% N	8,61% S

Nachweis des Schwefelwasserstoffs durch Bildung von
Methylenblau nach (42)

2 ml der die flüchtigen Schwefelverbindungen enthaltenden 40%igen Kalilauge wurden durch vorsichtige Zugabe von Eisessig angesäuert und die dabei freigesetzten SH-Verbindungen in 10 ml Wasser eingeleitet. Hierauf versetzte ich die wäßrige Lösung mit 0,2 ml konz. Salzsäure und 50 mg N,N-Dimethyl-p-phenylendiamin-HCl und fügte 3 Tropfen 1%iger Eisen(III)-chloridlösung hinzu. Die Lösung färbte sich zunächst rot, nach Umschwenken blau. Die Farbe war beständig.

Im Vergleichsversuch gab Methylmercaptan diese Reaktion nicht.

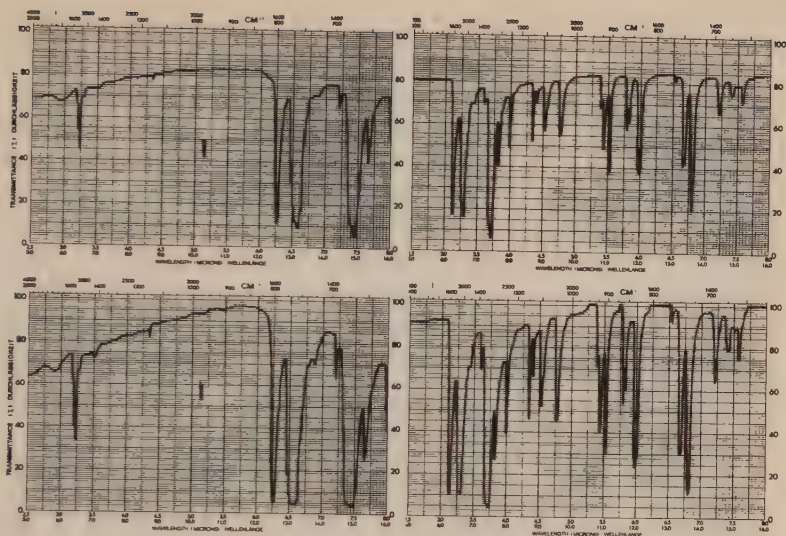


Abb. 35

IR-Spektren (KBr-Preßtechnik)

oben: isoliertes Schwefelwasserstoffderivat

unten: Bis-(2,4-dinitrophenyl)-sulfid

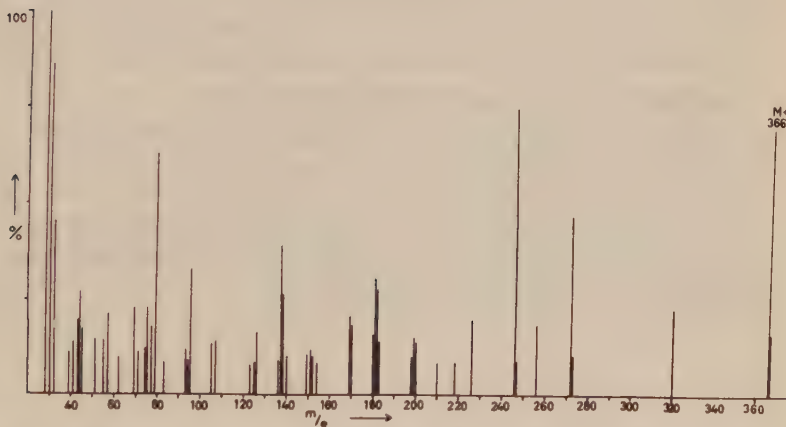


Abb. 36

Massenspektrum des isolierten Schwefelwasserstoffderivates (Bis-(2,4-dinitrophenyl)-sulfid)

Isolierung von Glucose

200 g gefriergetrocknetes Pilzmaterial wurden im Mörser zerstoßen und in die Hülse einer Soxhlet-Apparatur eingefüllt. Hierauf wurde 15 Stunden lang mit Äther extrahiert. Während der Extraktion trübte sich die Ätherlösung. Nach Stehen über Nacht konnte die überstehende Lösung von der mittlerweile sedimentierten Trübung abgossen werden. Nach Abdunsten des Äthers vom Pilzmaterial wurde in gleicher Weise und mit gleichem Ergebnis mit Aceton extrahiert.

Fällung des Osazons nach (50)

0,3 g Phenylhydrazin-Hydrochlorid wurden mit 0,6 g Natriumacetat in 5 ml Wasser gelöst. Zu dieser Lösung gab ich den in wenig Wasser aufgenommenen Zucker und erhitzte 1/2 Stunde auf dem siedenden Wasserbad. Der abgeschiedene Kristallniederschlag wurde abgesaugt und aus 70%igem Äthanol umkristallisiert.

Schmp.: 204 -205°C

Schmp. n. Lit.: 204 -205°C (50)

Fermentreaktion und Papierchromatographie

Zur Fermentreaktion wurde in der physiologisch-chemischen Analyse gebräuchliches "Glucotest"-Papier verwendet.

(Hersteller: C.F.Boehringer & Söhne, Mannheim)

Die zur weiteren Erhärtung der Nachweise durchgeführte papierchromatographische Trennung erfolgte unter den bei der Abbildung (17.) angegebenen Bedingungen.

Isolierung des 5-Dihydroergosterinesters

Der Ester wurde im Zuge der Isolierung des freien α -Phenylcrotonaldehyds unter den dort angegebenen Bedingungen gewonnen. Sein Rf-Wert betrug 0,9. Die Substanzzone war nach der Gewinnung bereits hinreichend rein für nähere Untersuchungen.

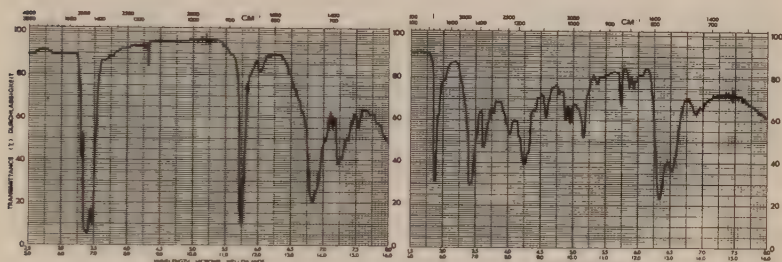


Abb. 37 IR-Spektrum des isolierten 5-Dihydroergosterinesters (KBr-Preßtechnik)

Spaltung des 5-Dihydroergosterinesters

Etwa 10 mg des Esters wurden in einem Kölbchen mit 1 ml 0,5 n äthanolischer Kalilauge versetzt. Hierauf erhitzte ich das Reaktionsgemisch 60 Min. lang auf dem siedenden Wasserbad unter Rückfluß, bis die ölige Phase vollständig in Lösung gegangen war. Nach Abkühlen wurde das Reaktionsprodukt unter Nachspülen mit sehr wenig Wasser in einen kleinen Scheidetrichter überführt und 3mal mit 1 ml Äther ausgeschüttelt. Sodann säuerte ich mit verd. Schwefelsäure an und extrahierte 3mal mit 1 ml Chloroform. Die organischen Phasen wurden mit wenig trockenem Natriumsulfat entwässert.

Gaschromatographische Kettenlängenbestimmung der bei der
Esterspaltung erhaltenen Fettsäure

Die Fettsäure wurde nach der angegebenen Vorschrift mit Methanol verestert und hierauf gaschromatographiert.

Gerät: Wilkens Autoprep A 700

Säule: 30% SE 30 (Silicon gum rubber methyl), 6 m, Ø 6 mm

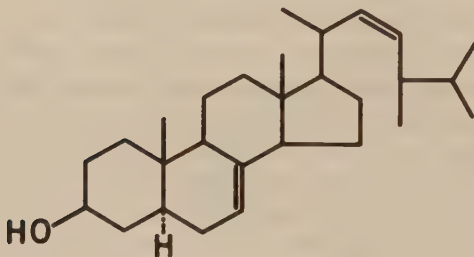
Temperatur (Säule): 302°C

Trärgas: Helium

Strömung: 200 ml/Min.

Der Methylester der unbekannten Fettsäure wies mit 12 Min. die gleiche Retentionszeit wie zum Vergleich mit eingespritzter Ölsäuremethylester auf. Identität mit Ölsäuremethylester war daraus allerdings nicht abzuleiten. Für die unbekannte Fettsäure konnte aus diesem Befund lediglich auf eine C-Zahl von 18 geschlossen werden, da unter den gegebenen Bedingungen nur die C-Zahl, nicht aber der Grad der Ungesättigtheit einen Einfluß auf die Retentionszeit hatte.

5-Dihydroergosterin (= 7,22-Ergostadien-3 β -ol)



Blättchen aus Äthanol.

Schmp.: 174 -176°C

Schmp.: n. Lit. 172 -175°C (32)

C₂₈H₄₆O

M.G.: 398,68

gefunden:

M.G.: 398 (aus dem Massenspektrum)

Optische Drehung:

$$\left[\alpha \right]_D^{20} = -19^{\circ} \text{ bis } -20^{\circ} \text{ (Chloroform) (32)}$$
 gefunden:
$$\left[\alpha \right]_D^{20} = -16^{\circ} \text{ bis } -17^{\circ} \text{ (Chloroform)}$$

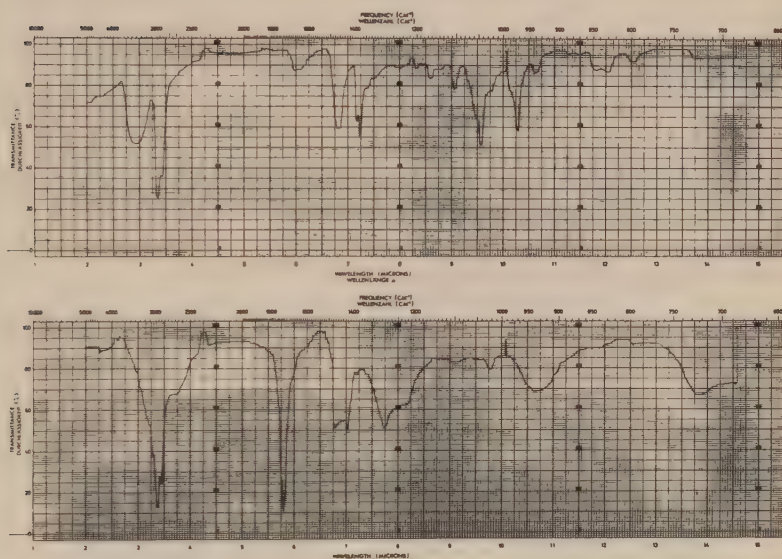


Abb. 38

IR-Spektren der Spaltprodukte des 5-Dihydroergosterinesters;
 oben: 5-Dihydroergosterin
 unten: ungesättigte C₁₈-Fettsäure
 (KBr-Preßtechnik bzw. Aufnahme als Film auf NaCl-Fenstern)

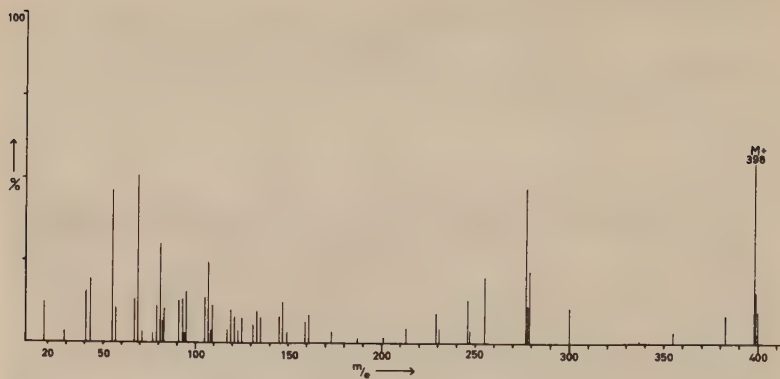


Abb. 39

Massenspektrum des isolierten
5-Dihydroergosterins

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- (1) ENGEL, F. "Pilzwanderungen" 6.Auflage,
Wittenberg 1965
- (2) SCHREMMER, F. Österr.bot.Z. 110, 380 (1963)
- (3) JAHN, H. "Pilze rundum", Hamburg 1949
- (4) SCHÄFFER,
Jacob Christian "Beschreibung des Gichtschwammes
mit grünschleimigem Hute",
Regensburg 1760
- (5) KROMBOLZ, J.V. "Naturgetreue Abbildungen und
Beschreibungen der essbaren,
schädlichen und verdächtigen
Schwämme", Prag 1831-1846
- (6) AYE, Dtsch.Apotheker-Ztg. 68,1027 (1932)
- (7) TABERNAEMONTANUS,
Jacobus Theodorus "Neu vollkommen Kräuterbuch ...
durch Caspar Bauhinum ... gebes=
sert", Basel 1731
- (8) LONICERUS, Adamus "Kräuterbuch", Ulm 1679
- (9) JONGHE, Adrianus de,
oder JUNIUS,Adrianus "Phalli ex fungorum genere in
Hollandiae sabuletis passim
crescentis descriptio, et ad vi=
vum expressa pictura ...",
Lugduni Batavorum 1601
(British Museum General Catalogue
of Printed Books, Vol. 119,
London 1962)
- (10) BRACONNOT, H. Ann. Chimie Vol.24, Tom.79-80
p.291 (1811)
- (11) ZELLNER, J. "Die Chemie der höheren Pilze",
Leipzig 1907
- (12) RATHAY, E. u.
B. HAAS S.-B. d. math.-naturw. Kl. d.
Akad. Wiss. Wien 87,I,18 (1883)
- (13) BOURQUELOT, E. Bull.Soc.Mycol.France 5,140 (1889)

- (14) KLEIN, G. u. M.STEINER Jb.wissensch.Bot. 68, 602 (1928)
- (15) STEINER, M. u. Naturwissenschaften 40,483 (1953)
E.STEIN v. KAMIENSKI
- (16) STEFANESCU, P. Med. Prom. SSSR 14,15-17 (1960)
Ref.: Chem. Abstr. 55,11763i (1961)
- (17) LIST, P.H. u. C.REINHARD Arch.Pharmaz. 295,564-571 (1962)
- (18) MUSTIER, J. u. Compt.Rend.Soc.Biol. 159(7),
M. COULET 1566-1570 (1965)
- (19) KALAB, M. u. Planta med. 14,126-130 (1966)
Z.MATLOCHA
- (20) BINDLER, J. Dissertation Marburg 1967
- (21) WIEGANDT, H. Naturwissenschaften 53,200 (1966)
- (22) DIEMAIR, W. u. Z. analyt. Chem. 189,151 (1962)
F. SCHAMS
- (23) MEHLITZ, A., Chemiker-Ztg./Chem.Apparatur
K. GIERSCHNER u. 87, 573-606 (1963)
T. MINAS
- (24) PAECH, K. u. "Handbuch der Pflanzenanalyse"
M.V.TRACEY Bd.II, Berlin,Göttingen,Heidel=
berg 1955
- (25) EEGRIWE, E. Z.analyt.Chem. 110,22-25 (1937)
- (26) DIEMAIR, W. u. Z.analyt.Chem. 189,161-175 (1962)
F.SCHAMS
- (27) BUTENANDT, A., Chem.Ber. 94,1931-1942 (1961)
D.STAMM u. E.HECKER
- (28) KUHN, R. u. J.MICHEL Chem.Ber. 71,1126 (1938.1)
- (29) BELLAMY, L.J. "Ultrarot-Spektrum und chemische
Konstitution", 2.Auflage,
Darmstadt 1966
- (30) "Organic Syntheses" Coll.Vol.I, Sec.Edition (Gilman/
Blatt), New York 1951, S.101-102

- (31) GEISSMAN, T.A. "The Chemistry of Flavonoid Com-
(Herausgeber) pounds", Pergamon Press 1962
- (32) KARRER, W. "Konstitution und Vorkommen der
organischen Pflanzenstoffe",
Basel-Stuttgart 1958
- (33) METCALFE, I.D. u. Analyt.Chem. 33/1,363-364 (1961)
A.A.SCHMITZ
- (34) THOMPSON, A.R. Austral.J.sci.Res., Ser. B4 180,
285 (1951)
- (35) BAMBERGER, E. u. Chem.Ber. 34,2032 (1901/II)
T.SCHEUTZ
- (35a)PRILESCHAJEW, N. J.russ.physik.-chem.Ges. 42,1416
Ref.: Chem.Zentralbl. 1281 (1911/I)
- (36) INOUE, Y. u. H.YUKAWA Chem.Abstr. 35,731 (1941)
- (37) WINTERNITZ, F. u. Bull.Soc.chim.France 509-515
C.H.WLOTZKA (1960,1)
- (38) BAYER, H. J.Chromatogr. 27,104-108 (1967)
- (39) KOLTHOFF, I.M. u. "Treatise on Analytical Chemistry"
P.J.ELVING (Hgb.) Part II, Vol. 7
- (40) PAECH, K. u. "Moderne Methoden der Pflanzen=
M.V.TRACEY analyse", Bd.IV, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1955
- (41) DAY, E.A. u. Microchem.J. 3,137-141 (1959)
S.PATTON
- (42) FISCHER, E. Chem.Ber. 16, 2234 (1883)
- (43) ROSENKRANTZ, H., J.biol.Chemistry 195,504 (1952)
A.T.MILHORAT u. M.FARBER
- (44) SCHNEIDER, D. Naturwiss.Rdsch. 20,319-326 (1967)
- (45) STAHL, E. "Dünnschichtchromatographie",
Heidelberg 1962
- (46) HALPAAP, H. Chemie-Ing.-Techn. 35,488-493
(1963)

- (47) "Organikum", 2.Auflage,
Berlin 1963
- (48) VIANI, R., F.MÜGGLER- Chimia 20,28-29 (1966)
CHAVAN, L.VUATAZ,
D.REYMOND u. R.H.EGLI
- (49) D'ANS-LAX "Taschenbuch für Chemiker und
Physiker" Bd.II, Berlin, Göt-
tingen, Heidelberg 1964
- (50) RINK, M. "Die Harnanalyse", Stuttgart 1964
- (51) LIST, P.H. u. Naturwissenschaften 53,585 (1966)
B.FREUND
- (52) LIST, P.H. u. Naturwissenschaften 54,368 (1967)
B.FREUND
- (53) LIST, P.H. u. Naturwissenschaften 54,648 (1967)
B.FREUND

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazeutische Technologie der Philipps-Universität Marburg in der Zeit von August 1965 bis Oktober 1967 unter Leitung von Herrn Prof. Dr. P.H. List, dem ich für sein stetes Interesse wie auch für die wohlwollende Förderung und Unterstützung der Arbeit herzlich danke.

Herrn Prof. Dr. H. Böhme bin ich für die großzügige Erlaubnis zu Dank verpflichtet, die vielfältigen Einrichtungen und Geräte des von ihm geleiteten Institutes für Pharmazeutische Chemie und Lebensmittelchemie der Universität Marburg benutzen zu dürfen.

Herrn Albert Lang, Münster/Westfalen, danke ich für die Mithilfe beim Sammeln von Pilzmaterial, Herrn Dr. Pook, Fa. C.H.Boehringer & Sohn, Ingelheim, für die Aufnahme von KMR-Spektren und den Herren Dr. Wilhelm Meise, Farbenfabriken Bayer AG, Leverkusen, und Dr. Uwe Zahorszky, Institut für Organische Chemie der Universität Marburg, für die Aufnahme von Massenspektren.

LEBENS LAUF

Am 30. Juli 1939 wurde ich als Sohn des Apothekers Anton Freund und seiner Ehefrau Irene, geb. Villinger, in Wuppertal geboren. 1941 verzogen wir nach Weiden bei Köln, wo ich vom Frühjahr 1946 an die Volksschule besuchte. 1949 verlegten meine Eltern ihren Wohnsitz nach Bergkamen/Westfalen. Ab 1950 besuchte ich das Gymnasium zu Kamen, an dem ich im März 1959 die Reifeprüfung ablegte.

Anschließend absolvierte ich die Praktikantenzeit in der Apotheke zu Rünthe/Westfalen, die mit dem Pharmazeutischen Vorexamen im Frühjahr 1961 beendet war.

In Ermangelung eines pharmazeutischen Laborplatzes studierte ich zunächst vom Sommersemester 1961 an zwei Semester am Institut für Anorganische Chemie der Universität Münster/Westfalen, zum 3. Semester konnte ich an das Institut für Pharmazeutische Chemie überwechseln, an dem ich im Herbst 1964 die Pharmazeutische Staatsprüfung ablegte.

Nachdem ich 6 Monate lang in der väterlichen Apotheke in Bergkamen als Kandidat gearbeitet hatte, nahm ich zum SS 1965 das Studium an der Universität Marburg auf und begann im August d.J. unter Leitung von Herrn Prof. Dr. P. H. List mit den Arbeiten an der vorliegenden Dissertation. Seit dem 1. Januar 1966 bin ich als wissenschaftliche Hilfskraft an dem von Herrn Prof. Dr. P. H. List geleiteten Institut für Pharmazeutische Technologie beschäftigt. Meine Bestallung als Apotheker erhielt ich am 9. Februar 1966.

Ein Teil des Ergebnisses der vorliegenden Dissertation wurde aus Prioritätsgründen in kurzen Originalmitteilungen veröffentlicht (51) (52) bzw. zur Veröffentlichung eingesandt (53).

